

**Organisation
menschlicher Immunglobulingene:**

**Analyse des K-Locus
durch Cosmidklonierung
und Pulsfeld-Gelelektrophorese**

Wulfing Lorenz

Disbui. München

1989

Organisation menschlicher Immunglobulingene:

Analyse des K-Locus durch Cosmidklonierung
und Pulsfeld-Gelelektrophorese

Dissertation
der Fakultät für Biologie der
Ludwig-Maximilians-Universität München

vorgelegt von
Wulfing Lorenz
aus Coburg

München 1989

vorgelegt am 12.4.1989

1. Berichterstatter: Prof. Dr. K. Wolf

2. Berichterstatter: Prof. Dr. H. Jäckle

Sondergutachter: Prof. Dr. H.G. Zachau

Tag der mündlichen Prüfung: 7.7.1989

Die vorliegende Arbeit wurde am Institut für Physiologische Chemie, Physikalische Biochemie und Zellbiologie der Universität München in der Zeit von März 1985 bis Juni 1988 durchgeführt.

Herrn Prof. Dr. H.G. Zachau danke ich für seine Unterstützung und Betreuung. Allen Kollegen der Abteilung danke ich für gute Zusammenarbeit und Diskussionen.

Die Ergebnisse dieser Arbeit wurden teilweise veröffentlicht:

Lorenz, W., Straubinger, B. und Zachau, H.G. (1987) Nucl. Acids Res. 15, 9667-9676

Lorenz, W., Schäble, K.F., Thiebe, R., Stavnezer, J. und Zachau, H.G. (1988) Mol. Immunol. 25, 479-484

Straubinger, B., Huber, E., Lorenz, W., Osterholzer, E., Pargent, W., Pech, M., Pohlenz, H.-D., Zimmer, F.-J. und Zachau, H.G. (1988) J. Mol. Biol. 199, 23-34

Meinen Eltern

Inhaltsverzeichnis

1.	Einleitung und Problemstellung.....	1
2.	Ergebnisse.....	6
2.1.	Cosmidbanken.....	6
2.1.1.	Konstruktionsprinzip der Cosmidbanken.....	6
2.1.2.	Isolierung hochmolekularer DNA aus Plazenta und Größenfraktionierung genomischer Restriktions- fragmente.....	7
2.1.3.	Umfang der abgesuchten Genbanken und Isolierung rekombinanter Cosmidklone.....	8
2.2.	Strukturuntersuchungen verschiedener Regionen des K-Locus.....	10
2.2.1.	Analyse der A-Regionen Aa und Ab.....	10
2.2.1.1.	Zuordnung zweier Cosmide zur 3'-Seite der A-Regionen.....	10
2.2.1.2.	Charakterisierung eines Homologieabbruchs im 3'-terminalen Bereich der A-Regionen.....	12
2.2.1.3.	Charakterisierung eines nicht duplizierten V_K -Gens der Aa-Region.....	13
2.2.1.4.	Versuche zur Extension der 3'-Seite der A-Regionen.....	15
2.2.1.5.	Versuche zur Extension der 5'-Seite der A-Regionen.....	18
2.2.1.6.	Untersuchungen an zwei Subregionen von cos656, die mit V_K -Proben schwach kreuzhybridisieren.....	21
2.2.2.	Charakterisierung eines Cosmids der O-Region.....	22
2.2.3.	Strukturanalyse und Versuche zur Extension der B-Region.....	24
2.2.3.1.	Charakterisierung des V_K -Gens B1.....	24

2.2.3.2.	Lokalisierung eines divergenten Gens der Subgruppe III in der B-Region.....	27
2.2.3.3.	Versuche zur Extension der B-Region.....	27
2.3.	Übersichtskartierung des K-Locus mit Hilfe der Pulsfeld-Gelelektrophorese.....	28
2.3.1.	Auswahl geeigneter Systeme und Bedingungen für die Pulsfeld-Gelelektrophorese.....	29
2.3.2.	Lokalisierung der duplizierten Regionen auf zwei NotI-Fragmenten.....	32
2.3.3.	Kartierung des K-Locus mit selten spaltenden Restriktionsnukleasen.....	35
2.3.3.1.	Zuordnung spezifischer Suchklone der einzelnen Regionen zu großen Restriktionsfragmenten.....	35
2.3.3.2.	Sind die auf Cosmiden lokalisierten Restriktions-spaltstellen auch in PC-3-DNA spaltbar ?.....	39
2.3.3.3.	Physikalische Karte und Minimalgröße des K-Locus..	40
2.3.4.	Vergleich zwischen DNAs der Zelllinie PC-3 und vier nicht verwandter Individuen.....	43
3.	Diskussion.....	45
3.1.	Klonierung V_K -Gene enthaltender Genombereiche in Cosmiden.....	45
3.2.	Nicht in die Subgruppen-Klassifikation passende V_K -Gene.....	48
3.3.	Implikationen der Übersichtskarte für weitere Klonierungsversuche im Bereich des K-Locus.....	49
3.4.	Wie werden die V-Gene des K-Locus umgelagert ?....	50
3.4.1.	Die V-J-Umlagerung der V_K -Segmente der B-Region...	52
3.4.2.	Umlagerung der V-Gene der duplizierten Regionen des K-Locus.....	53

4.	Materialien und Methoden.....	56
4.1.	Chemikalien und Enzyme.....	56
4.2.	Bakterienstämme, Vektoren und DNAs.....	57
4.3.	Kulturzellen.....	57
4.4.	Genbanken, Cosmide und Hybridisierungsklone.....	58
4.5.	Herstellung der Cosmidbanken V und VI.....	58
4.5.1.	Präparation der Vektorarme.....	58
4.5.2.	Präparation und Größenfraktionierung genomischer Restriktionsfragmente aus Plazenta-DNA.....	59
4.5.3.	Ligierung der Vektorarme mit größen- fraktionierter DNA.....	60
4.5.4.	In vitro-Verpackung und Transfektion der rekombinanten Cosmidklone.....	60
4.5.5.	Präparation der Koloniefilter und Anreicherung von Cosmidklonen.....	61
4.6.	Präparation von DNA.....	62
4.6.1.	Präparation von DNA aus Plazenta.....	62
4.6.2.	Präparation von DNA aus Kulturzellen.....	62
4.6.3.	Präparation hochmolekularer DNA in Agarosematrix.....	62
4.6.4.	Isolierung von Cosmid-, Plasmid- und M13-DNA.....	63
4.7.	Spaltung von DNA mit Restriktionsnukleasen.....	64
4.8.	Gelelektrophoresen und Isolierung von DNA- Fragmenten aus Agarosegelen.....	65
4.8.1.	Konventionelle Gelelektrophoresen bei konstantem und homogenem elektrischem Feld.....	65
4.8.2.	Pulsfeld-Gelelektrophoresen.....	65



4.8.3.	Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen....	66
4.9.	Klonierung von DNA-Fragmenten in pBR322- und M13-Vektoren.....	67
4.10.	DNA-Transfer und Hybridisierungen.....	67
4.11.	Radioaktive Markierung von DNA.....	68
4.12.	Zellkultur.....	68
4.13.	Biologische Sicherheit.....	69
5.	Zusammenfassung.....	70
6.	Literaturverzeichnis.....	73
7.	Abkürzungsverzeichnis.....	81
	Lebenslauf	

1. Einleitung und Problemstellung

Körperfremde Makromoleküle, Viren und Mikroorganismen, die in den Körper eingedrungen sind, werden vom Immunsystem der Wirbeltiere als Antigene erkannt und eliminiert. Die spezifische Ausschaltung dieser Antigene erfolgt durch die zellvermittelte und die humorale Immunantwort. In beiden Fällen werden die Antigene von Lymphozyten erkannt, die spezifische Antigenrezeptoren tragen. Auf den Antigenstimulus hin werden große Mengen an Antikörpern oder Lymphozyten bereitgestellt, die an das Antigen binden, was schließlich zu dessen Eliminierung führt (Übersicht Ref.1).

Die Spezifität der Immunantwort beruht auf der Spezifität der Bindung zwischen Antigen und Antigenrezeptor, bzw. zwischen Antigen und Antikörper. Bei der zellvermittelten Immunantwort ist hierfür der Antigenrezeptor auf den T-Lymphozyten, der T-Zellrezeptor, verantwortlich. Er erkennt ein Antigen nur dann, wenn es von einer Zelle zusammen mit einem Molekül des Haupt-histokompatibilitäts-Komplexes (MHC-Molekül) präsentiert wird (1,2). Dabei bindet ein MHC-Molekül relativ unspezifisch ein durch partielle Hydrolyse entstandenes Bruchstück des Antigens (prozessiertes Antigen) und präsentiert es dem T-Zellrezeptor (3). Ein MHC-Molekül kann verschiedene solcher kurzen Peptide binden (4), aber jedes Peptid wird von nur einem T-Zellrezeptormolekül erkannt, d.h. für die Spezifität der Antigenerkennung ist in diesem Fall der T-Zellrezeptor verantwortlich. Für jedes mögliche prozessierte Antigen muß der Organismus also T-Lymphozyten mit dem passenden T-Zellrezeptormolekül bereitstellen können.

Ähnlich verhält es sich bei der humoralen Immunantwort. In ihrem Verlauf wird ein undifferenzierter B-Lymphozyt nach Bindung eines Antigens an seinen Antigenrezeptor, ein Immunglobulin der Klasse M, dazu veranlaßt, sich zu teilen und zu Plasmazellen und Gedächtniszellen zu differenzieren. Die Plasmazellen synthetisieren und sezernieren Antikörper gegen dieses stimulierende Antigen, während die Gedächtniszellen für die

schnellere und effizientere sekundäre Immunantwort bei wiederholtem Kontakt des Organismus mit dem gleichen Antigen verantwortlich sind. Auch hier muß das Immunsystem für jedes mögliche Antigen ein passendes Immunglobulin synthetisieren können. Die Klärung der Frage, wie die genetische Information für diese große Anzahl verschiedener Proteine im Vertebratengenom gespeichert ist, war lange ein zentrales Ziel der immungenetischen Forschung.

Antikörper sind aus mehreren Domänen mit unterschiedlicher Variabilität zusammengesetzt. Ein Immunglobulin z.B. der Klasse G enthält je zwei identische schwere (H) und leichte (L) Ketten. Jede dieser vier Ketten besteht aus einer variablen (V_H , V_L) und einer konstanten Domäne (C_H , C_L). Die variablen Anteile sind verantwortlich für die Bindung des Antigens, während die konstanten Regionen der H-Ketten die Zugehörigkeit zu einer Immunglobulinklasse und damit die Funktion determinieren (5,6). Die C_H -Regionen aller Immunglobuline einer Klasse sind, von allelischen Unterschieden abgesehen, auch bei unterschiedlicher Antigenspezifität identisch. Nach der konstanten Domäne der L-Kette lassen sich die Antikörper des Menschen und der Maus in λ - und K-Typ einteilen, wobei 60 % der menschlichen Antikörper dem K-Typ angehören. Die variablen Domänen der L-Ketten vom K-Typ können in vier Subgruppen (V_{K_I} -IV, Ref.7,8,9) eingeteilt werden.

Aufgrund von Sequenzanalysen an L-Kettenproteinen wurde 1965 erstmals postuliert, daß in einer antikörperproduzierenden B-Zelle mehrere Gensegmente zu einem vollständigen Immunglobulingen zusammengeschaltet worden sind (10,11). Der Nachweis dieses Vorgangs wurde allerdings erst durch die Anwendung gentechnologischer Methoden erbracht (12). Es wurde gezeigt, daß die variable Domäne der L-Ketten aus einem V- und einem J-Segment zusammengesetzt wird (13,14,15) und die der H-Ketten aus je einem V-, D- und J-Segment besteht (16). Daraus ergeben sich bereits zwei Grundlagen für die Erzeugung der Antikörperdiversität. Die Anzahl der im Genom kodierten V-, D- und J-Segmente stellt die genetische Komponente, das Keimbahnrepertoire, dar. Aus der Möglichkeit, verschiedene L-Ketten mit verschie-

denen H-Ketten zu kombinieren und die einzelnen Ketten aus unterschiedlichen Gensegmenten zusammenzusetzen, ergibt sich die kombinatorische Diversität. Sie wird zusätzlich dadurch erhöht, daß die Verknüpfungsstellen der umgelagerten Segmente relativ flexibel sind (14,15). Diese Stellen können sogar Nukleotide enthalten, die nicht im Genom kodiert sind, sondern während des Umlagerungsvorgangs als sog. N-Segmente neu hinzugefügt werden (17,18). Schließlich beruht ein großer Teil der Antikörpervielfalt auf somatischen Mutationen, die durch einen bisher ungeklärten Mechanismus während der Zellteilung in umgelagerte V-Segmente eingeführt werden (19,20). Im Verlauf der primären Immunantwort auf ein Antigen nimmt der Anteil von B-Zellen mit mutierten Gensegmenten stark zu (21). Dadurch wird erreicht, daß die Affinität der synthetisierten Antikörper zum Antigen erhöht wird (21). Das Keimbahnrepertoire und die kombinatorische Diversität stellen also die Grundlage für das Einsetzen einer Immunantwort dar, während ihre Effizienz durch somatische Mutationen verbessert werden kann.

Neben dem singulären C_K -Segment stehen für die L-Ketten des K-Typs beim Menschen fünf J_K -Segmente zur Verfügung (6). Versuche, die Anzahl der V_K -Gensegmente mit Hilfe von Hybridisierungsexperimenten zu bestimmen, führten zu sehr unterschiedlichen Ergebnissen. Zunächst wurde ihre Zahl beim Menschen auf 15-20 geschätzt (22), später auf 50 (23). Beide Werte liegen deutlich unter der Zahl von 100-300 V_K -Segmenten, die für die Maus angenommen wird (24) oder der für beide Organismen geschätzten Anzahl von V_H -Segmenten (2). In der Arbeitsgruppe von Professor Zachau wurde der K-Locus des Menschen gewählt, um durch Klonierung des gesamten Locus die genaue Anzahl der V-Segmente zu bestimmen. In anderen Gruppen wird versucht, den Locus der H-Kettengene des Menschen zu klonieren (z.B. 25,26).

Durch die zusammenhängende Klonierung aller Gensegmente könnte noch eine weitere wichtige Frage beantwortet werden, und zwar die, nach welchen Mechanismen die Gensegmente umgelagert werden. Am 3'-Ende der V-Segmente und am 5'-Ende jedes J-Segments befinden sich Signalsequenzen, die während der Umlagerung vom Rekombinase-Enzymkomplex erkannt werden und das richtige

Zusammenschalten der Gensegmente gewährleisten (14,15,16). Je nachdem in welcher 5'-3'-Orientierung die Gensegmente relativ zueinander liegen, werden verschiedene Umlagerungsmechanismen diskutiert (5). Für den Fall, daß die V-Segmente invers zu den J-Segmenten liegen, wird angenommen, daß die V-J-Umlagerung nach einem Inversionsmechanismus erfolgt (18,27,28). Bei diesem Mechanismus wird das V-Segment mit der 5' anschließenden DNA-Sequenz bis zum jeweiligen J-Segment invertiert. Dadurch entsteht neben den miteinander verknüpften Gensegmenten ein reziprokes Rekombinationsprodukt aus der 5'-Flanke des J-Segmentes und der 3'-Flanke des V-Segmentes, ein f-Fragment (29,30). Hat das V-Segment die gleiche Transkriptionsrichtung wie das J-Segment, dann sind zwei verschiedene Modelle denkbar. Das eine ist der Deletionsmechanismus (15,31), bei dem die DNA zwischen den umgelagerten Segmenten als zirkuläres Intermediat deletiert wird. Beim zweiten Modell, der Umlagerung durch Schwesterchromatidaustausch (32,33) wird ein V-Segment auf dem einen Chromatid mit einem J-Segment auf dem anderen Chromatid verknüpft. Bei der darauffolgenden Zellteilung erhält eine Tochterzelle das Chromatid mit den umgelagerten Gensegmenten und die andere das Chromatid mit dem Flankenrekombinationsprodukt. Die Frage, welches der Modelle für eine V-J-Umlagerung zutrifft, kann zumindest teilweise beantwortet werden, wenn die relative Orientierung der Gensegmente bekannt ist.

In der Arbeitsgruppe von Professor Zachau wurde durch Ab-suchen verschiedener Genbanken eine größere Zahl genomischer Abschnitte, die V_K -Gene enthalten, kloniert (34-37). Drei der innerhalb des K-Locus lokalisierten Genomabschnitte, die A-, O- und L-Regionen genannt wurden, sind dupliziert (34,35,36). Auch die Region mit den J_K -Segmenten und dem C_K -Segment, die schon von der Gruppe um P. Leder beschrieben worden war (38), wurde in einem Cosmid kloniert (39). Diese Regionen sollten durch überlappende Cosmide erweitert werden, mit dem Ziel, den gesamten Locus in Form klonierter Fragmente zu überdecken.

Eine weitere Möglichkeit, die Struktur großer Genombereiche zu ermitteln, ist die Restriktionskartierung mit Hilfe selten spaltender Nukleasen und Pulsfeld-Gelelektrophorese. Diese Methode wurde z.B. zur Kartierung des Duchenne-Muskeldystrophie-Locus (40) oder des Locus für MHC-Moleküle der Klasse II (41) eingesetzt. In Verbindung mit der Klonierung genomischer Bereiche in Cosmiden sollte dieses Verfahren Aufschluß über Größe und Struktur des K-Locus geben und damit weitere Hinweise auf die Anzahl und Organisation der V_K -Gene liefern.

Bei Analysen zur chromosomalen Lokalisierung einiger klonierter Regionen durch andere Mitarbeiter unserer Arbeitsgruppe hatte sich herausgestellt, daß ein Teil dieser Regionen im Unterschied zum K-Locus selbst (42,43) nicht auf Chromosom 2 liegt (Orphonregionen, Ref.44). Da die in den translozierten Regionen lokalisierten V_K -Gene wahrscheinlich nicht an ein J_K -Segment umgelagert werden können, tragen sie nicht zum Keimbahnrepertoire bei und sind somit nicht zur Zahl der potentiell funktionellen V_K -Gene zu rechnen. Es sollte also für jede V_K -Gene enthaltende Region überprüft werden, ob sie innerhalb des K-Locus liegt. Neben der Analyse der chromosomalen Lokalisierung kann die Pulsfeld-Gelelektrophorese Hinweise auf die Lokalisierung einer Region innerhalb oder außerhalb des K-Locus liefern.

In der vorliegenden Arbeit sollten drei der klonierten, V_K -Gene enthaltenden Regionen durch Absuchen verschiedener Cosmidbanken mit Suchklonen aus diesen Regionen durch neue überlappende Cosmide erweitert werden ("chromosomal walking"). Weiterhin sollte mit Hilfe der Pulsfeld-Gelelektrophorese eine über die klonierten Regionen von jeweils 100 bis 200 kb Größe hinausreichende Restriktionskarte des K-Locus erstellt werden.

Unveröffentlichte Experimente anderer Mitglieder der Arbeitsgruppe, auf die in dieser Dissertation Bezug genommen wird, stammen von E. Huber, H.-G. Klobeck, A. Meindl, W. Pargent, H.-D. Pohlenz, K. Schäble, H. Smola, B. Straubinger, G. Weichhold und F.-J. Zimmer.

2. Ergebnisse

2.1. Cosmidbanken

Für die Klonierung von Human-DNA in *E. coli* stehen verschiedene Vektorsysteme wie Plasmide, Derivate des Phagen λ oder Cosmide zur Verfügung (45). Das Cosmidssystem ermöglicht die Klonierung bis zu 50 kb großer DNA-Fragmente (46,47), wobei durch die Benutzung des für λ -Phagen entwickelten in vitro-Verpackungssystems (48) relativ hohe Transfektionsraten erreicht werden können. Cosmide sind Plasmide mit der für die Verpackung in λ -Capside notwendigen λ -Sequenz (cos-Stelle). Außerdem enthalten sie ein oder mehrere Antibiotika-Resistenzgene, eine Reihe von Restriktionsspaltstellen für die Klonierung der Fremd-DNA und einen Replikationsursprung. Durch die enthaltenen λ -Anteile verhalten sich rekombinante Cosmide also bei der Verpackungsreaktion wie λ -Phagen, nach Verpackung der DNA in Phagenköpfe und Transfektion des Wirtsstammes replizieren sie aber wie Plasmide.

Dieses Vektorsystem bietet sich besonders für die überlappende Klonierung großer DNA-Bereiche und Erweiterung dieser Bereiche mit Hilfe des "chromosomal walking" an.

2.1.1. Konstruktionsprinzip der Cosmidbanken

Zwei verschiedene Cosmidgenbanken wurden mit Hilfe des Vektors pHCT9 (49) erstellt. Dazu wurde DNA aus der Plazenta N für Genbank V mit BglII (AGATCT) und für Genbank VI mit MspI (CCGG) partiell gespalten und über einen Saccharose-Gradienten größenfraktioniert. Diese beiden Enzyme haben die Eigenschaft, daß sie entweder wegen einer Erkennungssequenz von sechs Nukleotiden (BglII) oder wegen des Dinukleotids CpG innerhalb der Erkennungssequenz (MspI, Ref.50) in menschlicher DNA relativ selten spalten. Sie wurden deshalb gewählt, weil eine Cosmidgenbank, die unter Verwendung von Sau3A konstruiert worden war (51), schon mehrmals mit abnehmendem Erfolg mit verschiedenen

Suchklonen nach Cosmiden, die vorhandene Regionen extendieren, abgesucht worden war. Es wurde vermutet, daß der Grund hierfür in einer Häufung der Spaltstellen von Sau3A an den Enden der bereits klonierten Regionen lag. Eine ungleichmäßige Verteilung von Sau3A-Spaltstellen würde zu einer ebenso unstatistischen Verteilung und geringen Staffellung der isolierten Cosmide führen. Dies sollte durch Partialspaltung mit den Enzymen BglII und MspI umgangen werden.

Die "Vektorarme" für die Klonierung der BglII-gespaltenen Plazenta-DNA wurden hergestellt, indem zunächst pH79 mit ClaI bzw. mit SalI linearisiert wurde. Dann erfolgte eine Abspaltung der 5'-Phosphatgruppen mit Hilfe von alkalischer Phosphatase, um die Entstehung von Klonierungsartefakten durch Ligierung zweier genomischer DNA-Fragmente über zwei Vektormoleküle zu verhindern. Schließlich wurde die Klonierungsstelle mit BamHI freigelegt und die dabei entstehenden Vektorfragmente, welche die cos-Sequenz nicht enthalten, gelelektrophoretisch von den Vektorarmen abgetrennt. Die Präparation des Vektors für die Klonierung der MspI-gespaltenen DNA erfolgte analog durch Linearisierung von pH79 mit PvuI bzw. SalI und abschließender Spaltung mit ClaI (Klonierungsstelle).

2.1.2. Isolierung hochmolekularer DNA aus Plazenta und Größenfraktionierung genomischer Restriktionsfragmente

Die für Partialspaltungen eingesetzte DNA muß eine Mindestgröße von 100 kb aufweisen, damit man eine hohe Ausbeute an Fragmenten mit zwei ligierbaren Enden erhält (52). Zu diesem Zweck wurde DNA aus einer Plazenta (Plazenta N), die freundlicherweise von Prof. Kuß (Institut für Klinische Chemie und Klinische Biochemie der Universität München) zur Verfügung gestellt worden war, nach der Methode von Blin und Stafford (53) isoliert. Überprüfung auf einem 0,3 %igen Agarosegel ergab eine durchschnittliche DNA-Größe dieser Präparation von mindestens 200 kb. Um die Anzahl der Ligierungsartefakte gering zu halten, wurde die DNA nach der Partialspaltung mit alkalischer Phospha-

tase behandelt und anschließend ihre Religierbarkeit getestet. Danach wurden über einen Saccharose-Dichtegradienten Fragmente der Größe von 40 bis 50 kb angereichert (4.5.2.). Die Ligierung mit den Vektorarmen und die anschließende in vitro-Verpackung erfolgte wie in 4.5.3. und 4.5.4. beschrieben. Eine weitere mögliche Quelle für Artefakte bei der Konstruktion einer Cosmidgenbank stellt Rekombination der klonierten DNA im Wirtstamm dar. Um dies so gering wie möglich zu halten, wurde der $recA^-$ -Status des verwendeten Stammes *E. coli* 490A überprüft. Als Testsystem diente die relative UV-Sensitivität. Der Vergleich von $recA^-$ -Einzelkolonien mit Kolonien eines Stammes mit $recA^+$ -Phänotyp (*E. coli* LE392) zeigte, daß *E. coli* 490A keine Revertanten vom Typ $recA^+$ aufwies.

2.1.3. Umfang der abgesuchten Genbanken und Isolierung rekombinanter Cosmidklone

Für Genbank V (mit BglIII partialgespaltene DNA) wurden 6×10^5 Kolonien auf Membranfiltern (22 X 22 cm, GeneScreen plus, NEN) ausplattiert (52). Geht man von einer statistischen Verteilung der Cosmidklone über das Genom aus, so läßt sich die Auffindwahrscheinlichkeit einer beliebigen Sequenz nach Clarke und Carbon (54) berechnen. Danach war in Genbank V mit einer Wahrscheinlichkeit von 99,98 % jede Sequenz des menschlichen Genoms vertreten. Da diese Cosmidbank mit einer Reihe von Suchklonen abgesucht werden sollte, wurden zwei Sätze Replikafilter angefertigt und nacheinander mit den radioaktiv markierten Proben hybridisiert. Nach Autoradiographie wurden mehrere Kolonien im Bereich der positiven Signale abgenommen und erneut ausplattiert. Wiederum nach Hybridisierung der so hergestellten, angereicherten Koloniefilter konnten einzelne Kolonien isoliert werden. Diese wurden zur Überprüfung und Identifizierung gezogen, DNA aus Schnelllysaten mit BglIII gespalten, auf Agarosegelen aufgetrennt und auf Nylonmembranen transferiert. Nach

Hybridisierung mit dem jeweiligen Suchklon endgültig positive Klone wurden nach DNA-Präparation in größerer Menge (4.6.4.) genauer charakterisiert.

Die mit MspI partialgespaltene und mit Vektorarmen ligierte DNA wurde von W. Pargent weiterbearbeitet (Genbank VI, Ref.55). In Tabelle 1 sind die Cosmidgenbanken, die im Rahmen dieser Arbeit mit verschiedenen Extensionssuchklonen abgesucht wurden, zusammengefaßt.

Tabelle 1: Zusammenstellung der abgesuchten Cosmidbanken

Genbank (Ref.)	Partialsp. mit	Vektor	Anzahl Kolonien	Suchklon	isol. Cosmid
IIId (51,56)	Sau3A	pHC79 pJB8	3×10^5	m6410-17 m656-1 m111-7 mAF2-10	237
IIIe (51,56)	Sau3A	pHC79 pJB8	6×10^5	m656-1 m237-1	
607 (57)	HindIII	Lorist2	6×10^5	m656-1	607/5
V -	BglIII	pHC79	6×10^5	m656-1 m237-1 m659-2 m5-5	750 751

Die Herkunft der verschiedenen Suchklone und ihre Verwendung bei Extensionsversuchen ist in Kapitel 2.2. beschrieben.

2.2. Strukturuntersuchungen verschiedener Regionen des K-Locus

Ein Ziel der Arbeitsgruppe im Rahmen der Strukturanalyse des menschlichen K-Locus ist die überlappende Klonierung des Locus in der Keimbahn-Konfiguration. Zu diesem Zweck waren zunächst mehrere Phagen- und Cosmidbanken mit verschiedenen V_K -Proben abgesucht worden (34-37,58). Ein Ziel der vorliegenden Arbeit war es, Cosmide, die durch Hybridisierung mit V_K -Proben aus den Genbanken III und IV erhalten worden waren, mit Restriktionsnukleasen zu kartieren und gegebenenfalls schon vorhandenen Regionen zuzuordnen. Schließlich sollten diese Regionen mit Hilfe geeigneter Suchklone durch neue Cosmide erweitert werden.

2.2.1. Analyse der A-Regionen Aa und Ab

Die A-Regionen waren von B. Straubinger etabliert worden (35,59), indem er zunächst die mit der V_{KI} -Probe ml-3 (Ref.16) aus Genbank IIIa isolierten Cosmide 142 und 163 (Abb.7) kartiert und charakterisiert hatte. Dieser Kernbereich konnte von ihm durch chromosomal walking in 5'- und 3'-Richtung um die überlappenden Cosmide 211, 515, 516 und 663 erweitert werden. Die Lage dieser Cosmide innerhalb der A-Regionen ist in Abb.7 dargestellt.

2.2.1.1. Zuordnung zweier Cosmide zur 3'-Seite der A-Regionen

Die Cosmide cos656 und cos659 waren von H.-D. Pohlentz und H.-G. Bauer mit Hilfe V_{KII} - und V_{KIII} -spezifischer Suchklone aus Genbank IV isoliert worden (51,60). Nach Restriktionskartierung und Hybridisierung mit V_K -spezifischen Proben (2.2.2.) konnten beide Cosmide der 3'-Seite der A-Regionen zugeordnet werden, wobei cos656 mit der Situation Aa und cos659 mit der Situation Ab überlappte und in beiden Fällen die bereits klonierten Be-

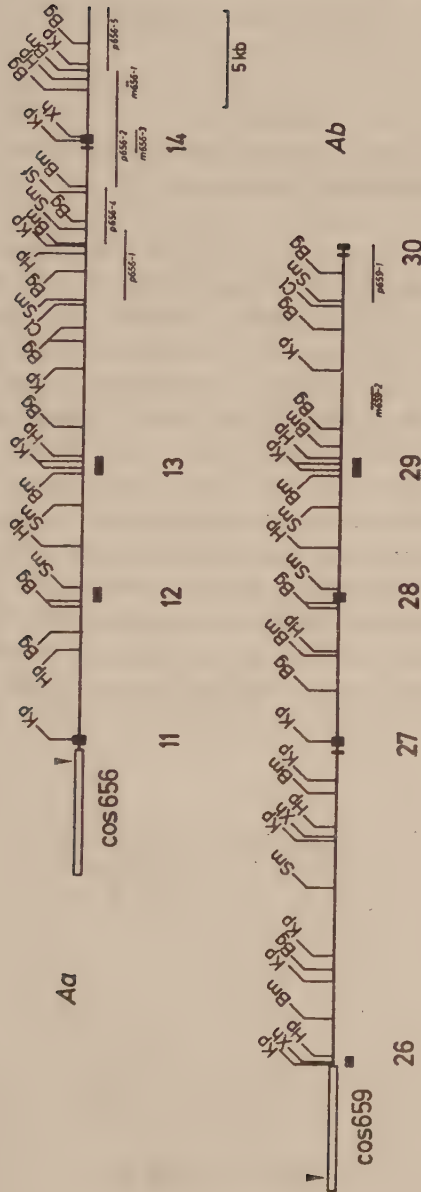


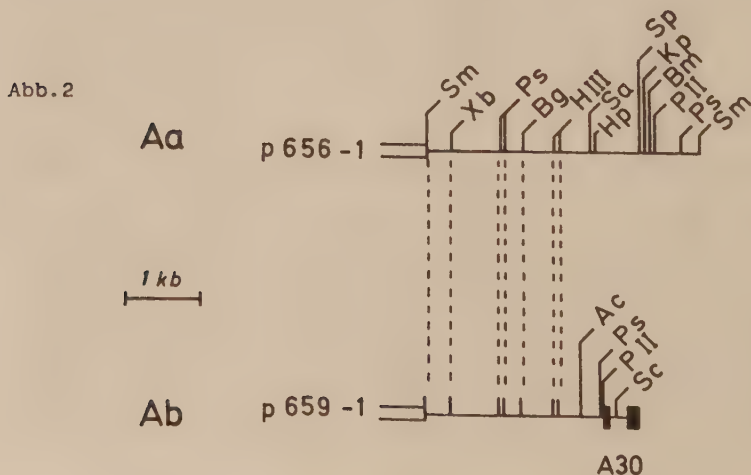
Abb.1: Restriktionskarten der Cosmidklone cos656 und cos659
(3'-Seite der A-Regionen)

Homologe Bereiche der Cosmide wurden untereinander gezeichnet. Die Positionen der V_K-Gene sind mit ausgefüllten Balken angegeben, wobei für sequenzierte Gene auch der Signalpeptid-anteil eingezeichnet wurde. Die Nummerierung der Gene entspricht der in Abb.7. Subklone sind durch horizontale Linien unter den Karten dargestellt. Auf die PvuI-Spalstelle des Vektors pHC79 ist jeweils durch ein Dreieck hingewiesen. Die für Restriktionsnukleasen verwendeten Abkürzungen sind im Abkürzungsverzeichnis erläutert.

reiche erweitert wurden. Die Restriktionskarten beider Cosmide sind in Abb.1, ihre Lage innerhalb der A-Regionen ist in Abb.7 dargestellt.

2.2.1.2. Charakterisierung eines Homologieabbruchs im 3'-terminalen Bereich der A-Regionen

Wie aus Abb.1 zu ersehen ist, bricht die Spaltstellen-Homologie zwischen den Situationen Aa und Ab kurz vor dem Gen A30 ab. Um diesen Homologieabbruch einzugrenzen, wurden die Subklone p656-1 und p659-1 erstellt. Das Ergebnis ihrer Feinkartierung ist in Abb.2 dargestellt. Bis 1 kb vor dem 3'-Ende von cos659 wurden keine Spaltstellenunterschiede gefunden, danach werden die beiden Duplikate völlig verschieden; auch das V_K^I -Gen fehlt an dieser Stelle in der Situation Aa. Daß dieser Befund nicht auf ein Klonierungsartefakt zurückzuführen ist, konnte zum einen mit PFG-Experimenten (2.3.3.1.) und zum anderen durch neu isolierte Cosmide, die diesen Bereich überdecken (Abb.7), gezeigt werden. Durch Hybridisierungsexperimente mit den Subgruppe I-Proben m1-7 und m1-4 (Abb.3) wurde gezeigt, daß das Gen A30 die gleiche 5'-3'-Orientierung hat wie die anderen V_K -Gene der Region Ab.



2.2.1.3. Charakterisierung eines nicht duplizierten V_K -Gens der Aa-Region

Unter nicht-stringenten Bedingungen hybridisiert das V_K -Gen A14 schwach mit der für Subgruppe I spezifischen Probe m1-3 (58). Nach Subklonierung des entsprechenden, 5,6 kb großen BamHI-Fragmentes wurde die 5'-3'-Orientierung dieses Gens durch Hybridisierung bestimmt (Abb.3). Diese Versuche zeigten, daß auch in der Aa-Region alle V_K -Segmente die gleiche 5'-3'-Orientierung haben. Mit subgruppenspezifischen Genproben und einer Probe aus der 5'-Flanke von A26 (m163-1, Ref.59) weist das Gen A14 ähnliche Hybridisierungseigenschaften auf wie das Genpaar A10/A26 (Ref.59,61). Das führte zu der Vermutung, daß es sich bei diesen drei Genen um Vertreter einer neuen Subgruppe, zumindest aber um eine definierte Subfamilie von V_{KI} -Genen handelt.

Um dieser Fragestellung nachzugehen, wurde das 1,1 kb große PstI/SacI-Fragment, welches das Gen A14 enthält, in M13 subkloniert (m656-3, Abb.3) und das Bandenmuster, das dieser Klon bei Hybridisierung gespaltener Plazenta-DNA ergibt, mit dem einer V_{KI} -Probe verglichen (Abb.4). Dabei ergab sich bei nicht-stringenten Hybridisierungsbedingungen (200 mM Phosphat) mit beiden

Abb.2: Feinkartierung zweier Subklone aus den Cosmiden cos656 und cos659 zur Eingrenzung des Homologieabbruchs zwischen den Duplikaten

Homologe Bereiche wurden untereinander gezeichnet und Spaltstellen, die in beiden Situationen vorhanden sind, wurden durch vertikale, gestrichelte Linien gekennzeichnet. Für p656-1 wurde das 3,5 kb große SmaI-Fragment in pBR322 subkloniert. Zur Konstruktion von p659-1 wurde cos659 mit SmaI und SalI gespalten, das überhängende Ende der SalI-Stelle im Vektor pHCT9 mit DNA-Polymerase I (Klenow-Fragment, Ref.62) aufgefüllt und anschließend zirkularisiert.

Um den Phagenklon $\lambda 5$ (Ref.63) eindeutig dieser Region zuzuordnen zu können, wurde das V_{KI} -Gen A30 von E. Huber sequenziert und mit der von A. Meindl erstellten Sequenz des auf $\lambda 5$ lokalisierten V_{KI} -Gens V5 (Ref.67) verglichen. Dabei stellte sich heraus, daß das Cosmid 659 innerhalb der Gensequenz (CDR1) endet (65).

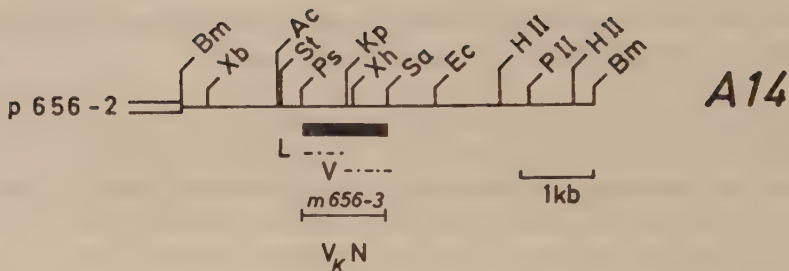


Abb.3: Feinkartierung und Bestimmung der 5'-3'-Polarität des V_K-Gens A14

Die 5'-3'-Polarität wurde durch Hybridisierung mit den Proben m1-7, einer V_KI-Genprobe (Ref.58), und m1-4, einem von H.-G. Klobeck konstruierten Klon, der die Signalpeptidsequenz des V_KI-Gens V1 (Ref.58) enthält, unter nicht-stringenten Bedingungen festgelegt. Inzwischen wurde das Gen A14 sequenziert (61).

Proben ein fast identisches Bandenmuster, während unter stringenteren Bedingungen (40 mM Phosphat) die A14-Probe ein anderes Bandenmuster erkennt als die V_KI-Probe, das sich aus weniger Fragmenten zusammensetzt. Dabei entsprechen in der BglII-Spaltung die 6,6 kb-Bande dem Gen A14 und die 7 kb-Bande dem Genpaar A10/A26, in der BamHI-Spaltung das 5,8 kb-Fragment A14 und die 15 kb-Bande dem Genpaar A10/A26. Sowohl in der BglII- als auch in der BamHI-Spaltung tritt eine zusätzliche, dritte Bande auf, die keinem bisher auf Cosmiden lokalisierten V_K-Gen zugeordnet werden konnte. Hier muß es sich entweder um ein Allel eines der drei Gene handeln oder um einen weiteren Vertreter dieser Gruppe von V_K-Genen, der in einer der Lücken zwischen den in Cosmiden klonierten Regionen (2.3.3.3.) lokalisiert ist.

Eine Sequenzanalyse der Gene A10 und A14 ergab, daß sie keiner der vier bekannten Subgruppen zugeordnet werden können, sondern möglicherweise eine neue Subgruppe - zwischen V_KI und V_KIII - bilden (61).

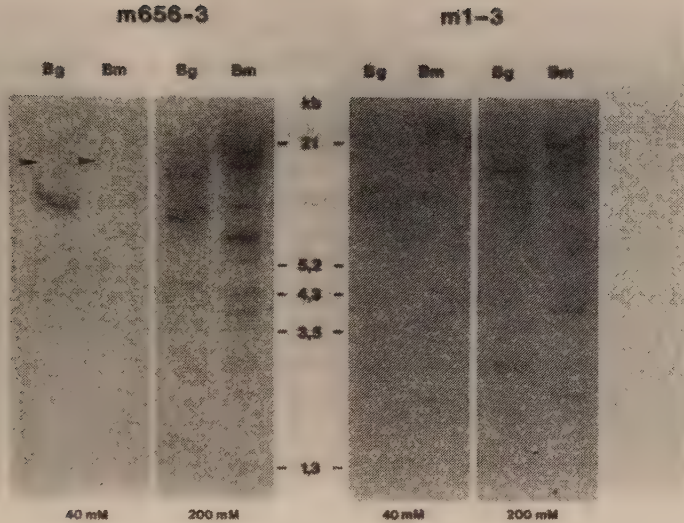


Abb.4: Vergleichende Plazenta-DNA-Hybridisierungen mit den Genproben m656-3 (A14) und m1-3 (V_K I, Ref.58)

Jeweils 10 μ g Plazenta-DNA (Individuum AF) wurden nach Spaltung mit BglII und BamHI aufgetrennt und auf eine Nylonmembran (GeneScreen plus) transferiert. Die Hybridisierungsbedingungen (Molarität des Phosphatpuffers im letzten Waschschriff bei 68°C) sind unter den Autoradiogrammen angegeben; die Fragmentgrößen des Markers sind in kb angegeben. Mit der Probe m656-3 hybridisierende Fragmente, die keinem bisher klonierten V_K -Gen zugeordnet werden konnten, sind mit (►) gekennzeichnet.

2.2.1.4. Versuche zur Extension der 3'-Seite der A-Regionen

Nachdem die A-Regionen durch die Cosmide 656 und 659 erweitert worden waren, sollten sie durch chromosomal walking in 3'-Richtung weiter extendiert werden. Da in diesem Bereich die Homologie zwischen den beiden Duplikaten abbricht (2.2.1.2.), wurden zu diesem Zweck zwei verschiedene Suchklone konstruiert. Es wurde das am 3'-Ende von cos656 liegende BamHI- Fragment isoliert, mit Sau3A nachgespalten und das daraus resultierende

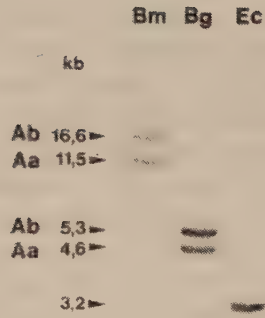
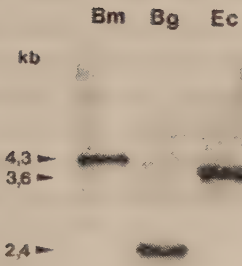
Fragmentgemisch in einen BamHI-gespaltenen M13-Vektor ligiert und transformiert. Die DNA einer Anzahl rekombinanter Phagenklone wurde gespalten, auf Membranfilter transferiert und sowohl mit radioaktiv markierter Plazenta-DNA als auch mit markierter pHC79-DNA hybridisiert. Klone, die mit beiden Proben kein Hybridisierungssignal ergaben, wurden angezogen, die DNA über CsCl-Gradienten gereinigt und schließlich die aus dem Vektor herausgespaltenen, hochligierten Fragmente radioaktiv markiert und in Gesamt-DNA-Hybridisierungen getestet. Dabei hybridisierte der Klon m656-1 in drei Plazenta-DNA-Spaltungen jeweils mit nur einer Bande (Abb.5a) und sollte somit als Extensionssuchklon geeignet sein.

Abb.5: Gesamt-DNA-Hybridisierungen (4.10.) zur Überprüfung der Extensionssuchklone aus dem 3'-Bereich der A-Regionen

Abb.5a zeigt das Autoradiogramm der Hybridisierung von gespaltenen Plazenta-DNA (Individuum AF) mit dem Klon m656-1, einem 0,3 kb Sau3A-Fragment subkloniert in mp11.

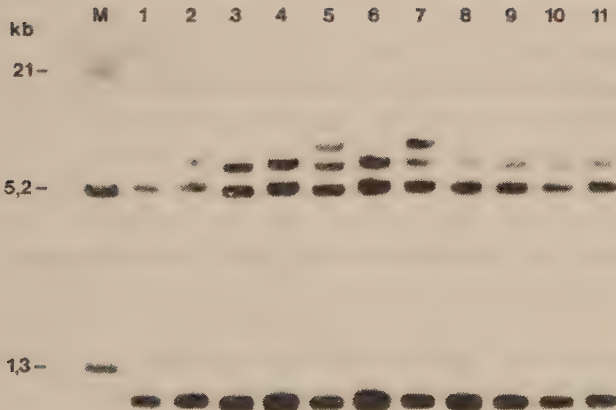
Abb.5b zeigt das Autoradiogramm der Hybridisierung von gespaltenen PC-3-DNA (64) mit dem Klon m659-2, einem 1,2 kb Sau3A-Fragment in mp10. Die verschiedenen Fragmentgrößen, die dieser Klon in BglII- und BamHI-gespaltenen DNA erkennt, wurden mit Hilfe von Cosmiden jeweils einer der beiden A-Regionen zugeordnet.

In Abb.5c ist das Autoradiogramm der Hybridisierung von BamHI-gespaltenen DNA von elf verschiedenen Individuen mit dem Klon m5-5 (Ref.65) dargestellt. PFG-Analyse hatte gezeigt, daß alle Fragmente, die dieser Klon erkennt, im Bereich der A- und L-Regionen liegen (2.3.3.). Deshalb wurde er trotz des komplexen Bandenmusters, das er erkennt, als Suchklon eingesetzt. Nach Hybridisierung aller in der Arbeitsgruppe isolierten Cosmide konnte zumindest ein Teil der in Gesamt-DNA hybridisierenden Fragmente lokalisiert werden. Das 1,3 kb-Fragment ist das klonierte Fragment selbst und liegt in der Ab-Region (λ 5). In den L-Regionen konnte an zwei Stellen ein hybridisierendes, 5 kb großes BamHI-Fragment lokalisiert werden: 1) Lb 5', cos105, cos136; 2) Lb 3', cos19, cos135. Bei der 7 kb-Bande handelt es sich wahrscheinlich um das Duplikat der 1,3 kb-Bande und bei dem 10 kb-Fragment, das nur bei einem Teil der Individuen erscheint, um ein Allel einer der 5 kb-Banden. Folgende DNAs waren verwendet worden:
Spur 1-10: DNA aus Blut von Individuen 11-20 (Ref.55)
Spur 11: DNA aus der Zelllinie PC-3



5a) m656-1

5b) m659-2



5c) m5-5

Um zu einem entsprechenden Suchklon aus der Ab-Region zu gelangen, wurde zunächst gespaltene und transferierte DNA des aus dem 3'-Ende von cos659 stammenden Subklons p659-1 (Abb.2) mit markierter Plazenta-DNA hybridisiert. Klonierung der nicht hybridisierenden Fragmente in M13 und Austesten dieser auf genomischer DNA führte zu keinem geeigneten Klon. Deshalb wurde mit dem weiter 5' liegenden, 5,3 kb großen BglII-Fragment (Abb.1) wie oben beschrieben verfahren und so der Suchklon m659-2 (Abb.5b) hergestellt. Abschließend wurden mit jedem konstruierten Extensionssuchklon die DNAs aller bisher von der Arbeitsgruppe isolierten Cosmide und λ -Phagen hybridisiert, um sicherzugehen, daß nicht eine Überlappung mit anderen bereits charakterisierten Bereichen des K-Locus übersehen wurde.

Mehrere Cosmidbanken wurden mit diesen Klonen abgesucht (Tab.1), wobei nur die zwei innerhalb der Aa-Region liegenden, rückläufigen Cosmide 607/5 und 750 isoliert wurden (Abb.7). Deshalb wurde der Suchklon m5-5 (Abb.5c), der von E. Huber aus dem Phagenklon λ 5 (Abb.7) konstruiert worden war (65), zusätzlich zum Absuchen von Genbank V eingesetzt. Er lieferte jedoch nur ein Cosmid (cos751), das ein Ligierungsartefakt darstellt: 20 kb einer unbekannten Region waren mit einem 20 kb langen Bereich der Lb-Region ligiert worden, in dem ein 5 kb-BamHI-Fragment lokalisiert ist, das mit diesem Klon kreuzhybridisiert (Abb.5c).

Somit konnte trotz Absuchen dreier verschiedener Cosmidbanken mit mehreren Suchklonen keine Extension der A-Regionen in 3'-Richtung erzielt werden.

2.2.1.5. Versuche zur Extension der 5'-Seite der A-Regionen

Um die A-Regionen in 5'-Richtung zu erweitern, wurde der von A. Meindl konstruierte Suchklon m6410-17 eingesetzt. Er stammt aus der 5'-Flanke des in der lymphoiden Zelllinie RPMI 6410 umgelagerten V_K II-Gens (66,67), dessen Keimbahnäquivalent sehr wahrscheinlich das Gen A17 (Abb.7) darstellt (67). Das Absuchen von Genbank IIId (Tab.1) mit diesem Klon führte zur Isolierung des Cosmids 237. Es enthält vier V_K -Gene, weist zwei

Spaltstellenunterschiede zur soweit klonierten Aa-Situation auf und extendiert diese um 10 kb. Durch Hybridisierung mit dem von W. Pargent konstruierten Klon m146-8 (Ref.55) konnte gezeigt werden, daß cos237 mit Cosmid 146 aus der Ob-Region (36,55) überlappt. Damit waren zwei große klonierte Bereiche des K-Locus durch chromosomal walking zu einer zusammenhängenden Region von 260 kb verbunden worden.

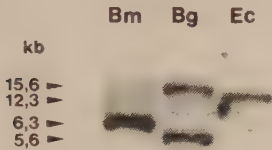


Abb.6: Hybridisierung von gespaltenen Plazenta-DNA (AF) mit dem Suchklon m237-1

Die Versuchsbedingungen sind in 4.10. beschrieben. m237-1 ist ein 1,2 kb großes EcoRV-Fragment, kloniert in M13 mp10/SmaI.

Um die vorläufige Zuordnung des Cosmids zur Ab-Region, die auf den zwei Spaltstellenunterschieden zur Aa-Region beruhte, abzusichern, wurde der Subklon m237-1 konstruiert. Seine Gesamt-DNA-Hybridisierung ist in Abb.6 und seine Lage innerhalb cos237 ist in Abb.7 dargestellt. Mit Hilfe von PFG-Analyse (2.3.2.) und von W. Pargent durchgeführten Hybridisierungen von DNAs verschiedener, nicht verwandter Individuen mit diesem Klon (55) konnte gezeigt werden, daß cos237 tatsächlich der b-Kopie der A-Regionen zuzuordnen ist.

Das daraus resultierende Gesamtbild der A-Regionen zeigt Abb.7. Versuche, durch Absuchen zweier Genbanken mit dem Klon m237-1 (Tab.1) die Lücke innerhalb der Ab-Region zu schließen, blieben erfolglos.

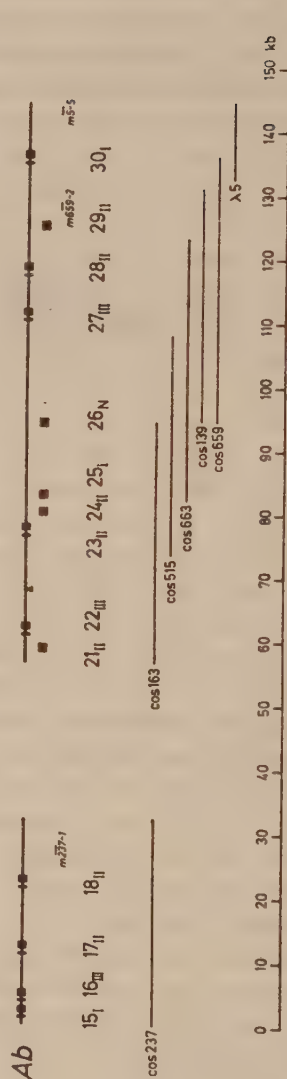
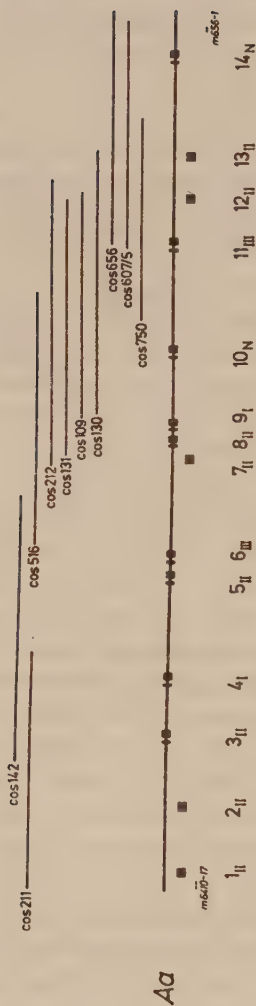


Abb.7: Gesamtdarstellung der A-Regionen Aa und Ab

Die Restriktionskarten der überlappenden Klone sind zusammenfassend dargestellt. Die Karten der Cosmide cos237, 656, 659, 750 und 607/5 wurden im Rahmen dieser Arbeit erstellt. Die Cosmidklone 142, 211, 163, 515, 516 und 663 wurden von B. Straubinger (35,59), cos130, 131, 139 und 212 von F.-J. Zimmer (35,56) und cos109 sowie λ 5 von H. Smola (63) kartiert. Spaltstellen, die in beiden Regionen vorliegen, sind als senkrechte Striche dargestellt, solche, die in einer Region fehlen, als Pfeile. Dabei zeigt die Pfeilspitze auf die Region, in der die Spaltstelle vorhanden ist. Die abgebildeten Bereiche enthalten keine Spaltstellen der Enzyme NruI, SalI, PvuI und MluI. Die Subgruppenklassifizierung der V_K -Gene ist durch römische Ziffern angegeben. Der Pfeil in Ab bei Position 70 kb weist auf ein 0,7 kb langes Stück hin, das nur in Ab vorliegt. Die im Rahmen dieser Arbeit eingesetzten Extensionssuchklone sind unter den Restriktionskarten als horizontale Linien angegeben. Da cos237 mit der Region Ob überlappt (35,55), sind die Gene A15 und A16 identisch mit O19 und O20 (Ref.36).

2.2.1.6. Untersuchungen an zwei Subregionen von cos656, die mit V_K -Proben schwach kreuzhybridisieren

Im Rahmen seiner Versuche zur Bestimmung der Anzahl der V_K -Gene war cos656 von A. Meindl mit verschiedenen V_K -Proben hybridisiert worden. Dabei ergaben zwei BamHI-Fragmente des Cosmids mit den Proben m607-3 (V_{KII} , Ref.68), mEV (V_{KIII} ; Abb.10) und m41-7 (V_{KIII} , Ref.66) ein schwaches Signal sowohl unter nicht-stringenten als auch unter stringenten Hybridisierungsbedingungen (67). Da die Möglichkeit bestand, daß es sich bei diesen kreuzhybridisierenden Regionen um divergente V_K -Gene handelt, wurden beide BamHI-Fragmente in pBR322 subkloniert (p656-4 und p656-5, Abb.1) und feinkartiert. Die Ergebnisse von A. Meindl konnten allerdings weder mit Hybridisierungen nach der Phosphat-Methode (69) noch nach der SSC-Methode (70) reproduziert werden. Damit ließen sich die hybridisierenden Bereiche auch nicht einengen, was die Voraussetzung für eine Sequenzanalyse gewesen wäre. Es konnte also nicht geklärt werden, was zur Kreuzhybridisierung dieser beiden Regionen mit V_K -Proben führte.

2.2.2. Charakterisierung eines Cosmids der O-Region

Das Cosmid 216 war von B. Straubinger mit Hilfe der V_{KII} -Probe m607-3 (Ref.68) aus Genbank IIIc isoliert worden (59). Im Rahmen dieser Arbeit wurde es mit Restriktionsnukleasen kartiert (Abb.8a) und mit für die Subgruppen I bis III spezifischen V_K -Proben hybridisiert (Abb.8b). Durch Vergleich der Restriktionskarte (Abb.9) mit anderen in der Arbeitsgruppe kartierten Cosmiden konnte cos216 der Ob-Region zugeordnet werden (36).

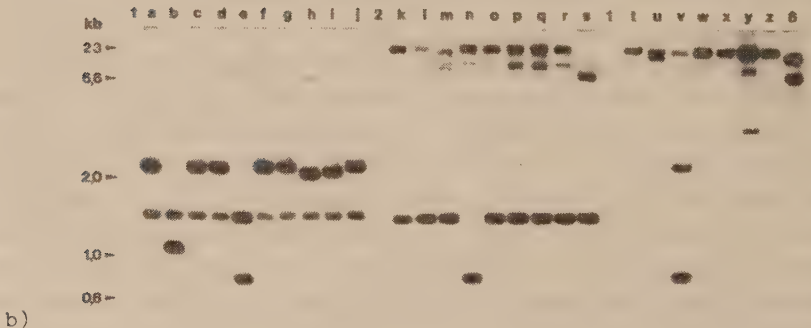
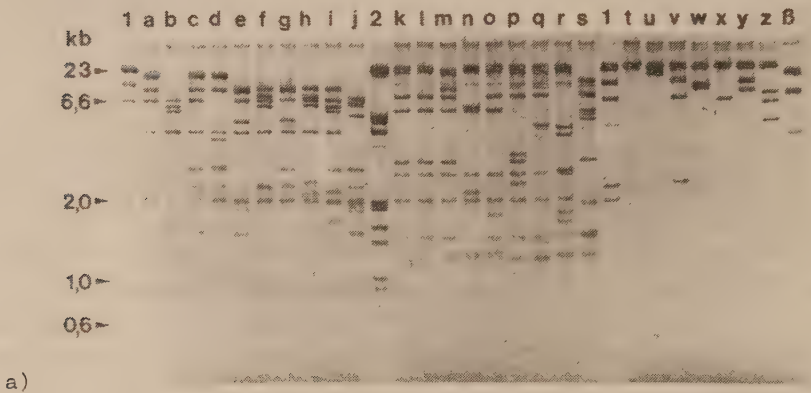


Abb.8

Abb.8: Restriktionskartierung des Cosmids cos216

Abb.8a zeigt die Photographie eines 0,8 %igen, Ethidiumbromid-gefärbten Agarosegels unter UV-Licht. Elektrophoretisch aufgetrennt wurden Einzel- und Doppelspaltungsprodukte von cos216. Bei den Spuren a-β handelt es sich um folgende Restriktions-spaltungen: a, BglIII; b, BglIII/BamHI; c, BglIII/SmaI; d, BglIII/XhoI; e, BglIII/KpnI; f, BglIII/ClaI; g, BglIII/SalI; h, BglIII/BstEII; i, BglIII/HpaI; j, BglIII/EcoRV; k, BamHI; l, BamHI/SmaI; m, BamHI/XhoI; n, BamHI/KpnI; o, BamHI/ClaI; p, BamHI/SalI; q, BamHI/BstEII; r, BamHI/HpaI; s, BamHI/EcoRV; t, SmaI; u, SmaI/XhoI; v, SmaI/KpnI; w, SmaI/ClaI; x, SmaI/SalI; y, SmaI/BstEII; z, SmaI/HpaI; β, SmaI/EcoRV. Als Größenmarker wurde mit HindIII (1), bzw. mit HindIII und EcoRI (2) gespaltene DNA des Phagen λ aufgetragen.

In Abb.8b ist das Autoradiogramm der Hybridisierung der in Abb.8a beschriebenen Spaltungen mit einer V_K -Probe der Subgruppe II, m607-4 (Ref.68). Der letzte Waschschritt der Hybridisierung erfolgte bei 2 X SSC und 68°C.



Abb.9: Restriktionskarte des Cosmidklons cos216

Die Numerierung der Gene entspricht derjenigen in Ref.55. Die Position der PvuI-Stelle des Vektors pJB8 ist durch ein Dreieck markiert.

2.2.3. Strukturanalyse und Versuche zur Extension der B-Region

Die B-Region (Abb.10) wurde etabliert, indem H.-G. Klobeck mit dem Klon mJI-16 aus Genbank IIIb das Cosmid 111 isolierte und mit der gleichen Probe aus einer Phagenbank die überlappenden Klone λ AF-1 und λ AF-2 isolierte (37,51). Die drei Klone enthalten das einzige im menschlichen Genom vorkommende V_K -Gen der Subgruppe IV, dessen 5'-Flanke spezifisch von dem Suchklon mJI-16 erkannt wird (37).

2.2.3.1. Charakterisierung des V_K -Gens B1

Bei der Analyse von cos111 durch Hybridisierung mit verschiedenen V_K -Genproben wurde von H.-D. Pohlenz das V_K -Gensegment B1 nachgewiesen und aufgrund seiner Hybridisierungseigenschaften der Subgruppe III zugeordnet (51). Um die 5'-3'-Orientierung dieses Gens festzulegen, wurde der Subklon p111-10 konstruiert, feinkartiert (Abb.10) und mit einer Reihe von Proben hybridisiert, die spezifisch sind für die Gen- und Signalpeptidbereiche der V_K -Gene verschiedener Subgruppen (m1-3, m1-4, m21-4, m41-7, m41-5, m41-3, Tab.4). Dabei wurden nur mit den für die Genbereiche spezifischen Proben Hybridisierungssignale erhalten. Die Proben aus den Signalpeptidbereichen und der Klon m41-3, der die 5'-Flanke eines V_{KIII} -Gens enthält, ergaben kein Signal. Deshalb konnte die in Abb.10 dargestellte 5'-3'-Polarität dieses Gensegments erst nach Sequenzanalyse durch K. Schäßle (71) festgelegt werden. Da dieses Gen nur sehr schwach mit den Proben der Subgruppen I und III hybridisiert, wurden mit dem Subklon m111-8 (Abb.10) vergleichende Gesamt-DNA-Hybridisierungen durchgeführt. Wie aus Abb.11 zu ersehen ist, erkennt dieser Klon unter nicht-stringenten Bedingungen ein ähnlich komplexes Bandenmuster wie die Subgruppe III-Probe m41-7. Unter stringenten Hybridisierungsbedingungen dagegen erkennt der B1-Klon nur zwei Fragmentgrößen in BglII- und BamHI-gespaltener DNA. Jeweils ein Signal läßt sich B1 zuordnen, während das zweite Signal aus keiner der bekannten V_K -Genregionen

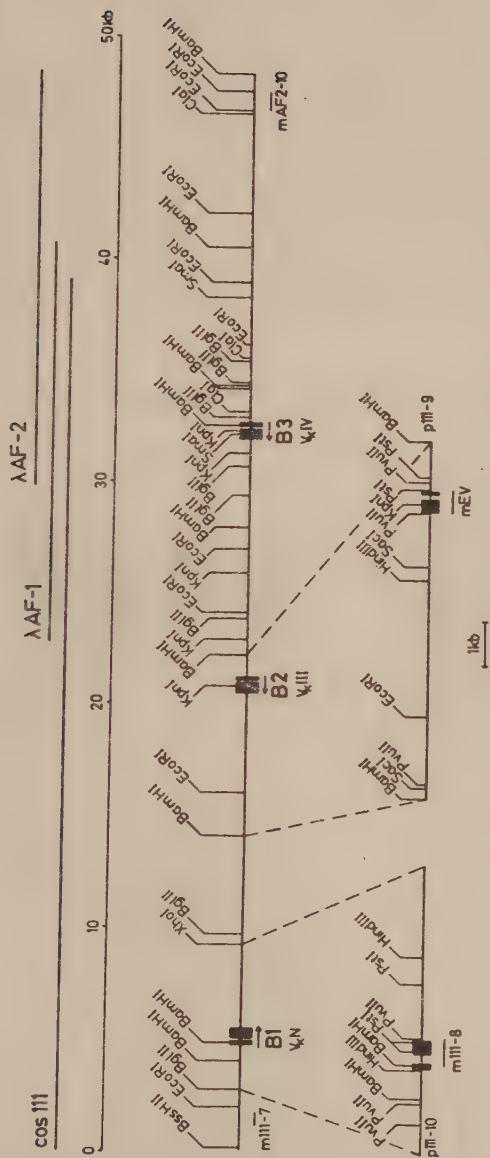


Abb. 10: Restriktionskarte der B-Region

Auf die Transkriptionsrichtung der V_K -Gene wurde durch einen Pfeil hingewiesen. Die Orientierung der Karte erfolgte gemäß der Transkriptionsrichtung der J_K - und C_K -Segmente, die bei Verlängerung der Karte in 5'-Richtung bei Position 60 kb liegen (57). Zwischen den Positionen 23,8 und 29,4 kb befinden sich fünf BglII-Stellen, die nicht kartiert wurden (51). Der Klon mEV ist ein 600 bp PstI/PvuII-Fragment in mp10 und wurde von J. Stavnezer zur Verfügung gestellt. Der Sucklion mAF2-10 wurde von H.-G. Klobeck konstruiert (57).

stammt und damit ein bisher unbekanntes V_K -Gen repräsentiert. K. Schäble isolierte mit Hilfe dieses Klons aus Genbank VI ein Cosmid, das die B-Region in 5'-Richtung extendiert (71).

Die ebenfalls von K. Schäble durchgeführte Sequenzanalyse des Gens B1 zeigte, daß es sich hier - bis auf eine Punktmutation im Startcodon - um ein potentiell funktionelles Gen handelt, das keiner der vier bisher definierten Subgruppen eindeutig zugeordnet werden kann. Das V_K -Gen B1 stellt also einen Vertreter einer aus zwei oder wenig mehr Mitgliedern bestehenden Gruppe von Genen dar, die entweder eine neue Subgruppe oder eine relativ divergente Subfamilie von V_{KIII} -Genen bilden (72).

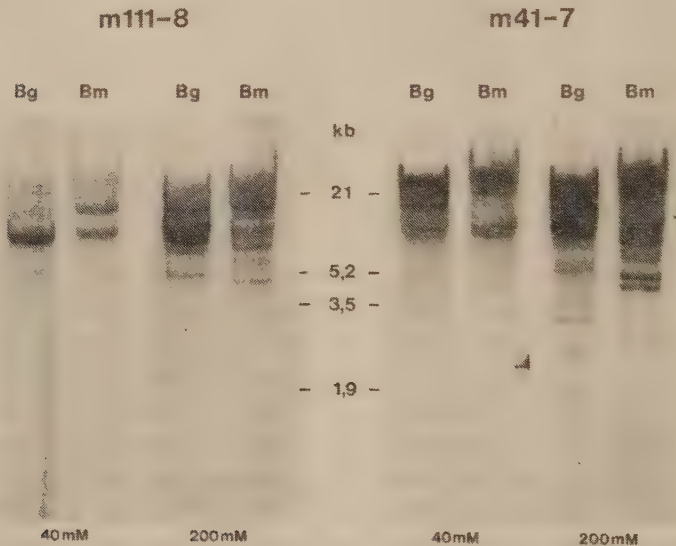


Abb.11: Vergleichende Gesamt-DNA-Hybridisierungen mit den Gen-Proben m111-8 (B1) und m41-7 (V_{KIII} , Ref.66)

Die Versuchsbedingungen entsprachen denjenigen in Abb.4 (Marker-Fragmentgrößen neben den Autoradiogrammen). Bei Hybridisierung mit dem Klon m111-8 unter stringenten Bedingungen (40 mM Phosphat) treten in der BamHI-Spaltung zwei Banden auf. Die größere (9,6 kb) wurde dem Gen B1 selbst zugeordnet, während die kleinere (7,8 kb) einem unbekannten V_K -Gen entspricht (72). In BglIII-gespaltener DNA hybridisieren wahrscheinlich beide Gene mit einem 7,2 kb großen Fragment.

2.2.3.2. Lokalisierung eines divergenten Gens der Subgruppe III in der B-Region

Ein weiteres Gen, dessen Nukleotidsequenz stark von den vier Subgruppen abweicht (73), stellt das Gen B2 dar. Es wurde mit Hilfe des von J. Stavnezer zur Verfügung gestellten Klons mEV (Abb.10) innerhalb der B-Region lokalisiert. Durch Subklonierung und Feinkartierung des entsprechenden Bereichs (p111-9, Abb.10) und anschließendem Vergleich der Restriktionskarte mit Ref.73 wurde die 5'-3'-Orientierung relativ zu den anderen Gensegmenten dieser Region festgelegt.

2.2.3.3. Versuche zur Extension der B-Region

Um die B-Region in 5'-Richtung zu extendieren, wurde der Suchklon m111-7 (Abb.10, Abb.12) konstruiert. Für Extensionsversuche in 3'-Richtung stellte H.-G. Klobeck den Klon mAF2-10 (57) zur Verfügung. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde Genbank IIIId (Tab.1) mit beiden Klonen abgesucht, wobei allerdings keine Cosmide isoliert werden konnten. Weitere, von F.-J. Zimmer unternommene Extensionsversuche (56,57) führten zwar zu keiner Erweiterung der B-Region in 5'-Richtung, aber durch Extension in 3'-Richtung zur Verknüpfung mit der J_K-C_K -Region.

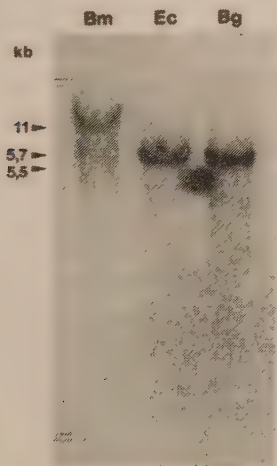


Abb.12: Plazenta-DNA-Hybridisierung zur Überprüfung des Extensionssuchklons m111-7

Zur Konstruktion von m111-7 war der 5'-terminale Bereich von cos111 (bis zur XhoI-Stelle, Abb.10) feinkartiert worden und nach Hybridisierung mit markierter GesamtdNA war das nicht hybridisierende 0,65 kb HindIII-Fragment in mp10 subkloniert worden.

2.3. Übersichtskartierung des K-Locus mit Hilfe der Pulsfeld-Gelelektrophorese

Im Rahmen der Strukturanalyse des K-Locus wurden in der Arbeitsgruppe mehrere genomische Regionen in Cosmiden und λ -Phagen kloniert. Von einigen dieser Regionen konnte E. Lötscher zeigen, daß sie nicht auf Chromosom 2, also außerhalb des K-Locus liegen (44). Drei der auf Chromosom 2 lokalisierten Regionen sind dupliziert (A,O,L, Ref.34,35,36), die B-C_K-Region (57, vorl. Arbeit) kommt einmal im menschlichen Genom vor (37), und die W-Regionen sind mehrfach amplifiziert (56).

Nun ging es darum, die Lage der 100 bis 200 kb großen, V_K-Gene tragenden DNA-Bereiche auf Chromosom 2 relativ zueinander festzustellen. Für eine solche Kopplungsanalyse gibt es verschiedene Möglichkeiten. Eine davon ist im Prinzip die genetische Kopplungsanalyse mit Hilfe geeigneter DNA-Proben, die innerhalb der zu untersuchenden Regionen Restriktionsfragment-Längenpolymorphismen (RFLPs) erkennen. Dabei ist allerdings die Analyse einer großen Zahl verwandter Individuen aus mehreren Generationen notwendig. Weiterhin sind hierfür die vermuteten Abstände zwischen den klonierten Regionen zu klein, und das Vorhandensein duplizierter Regionen hätte eine solche Analyse nicht gerade vereinfacht.

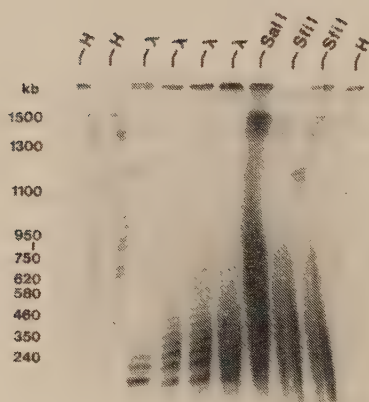
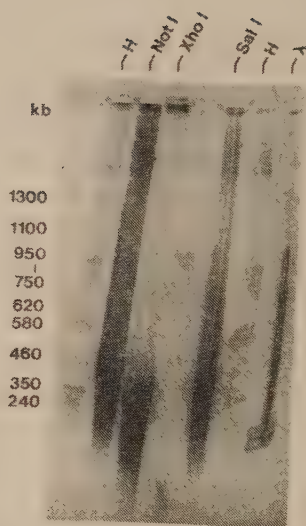
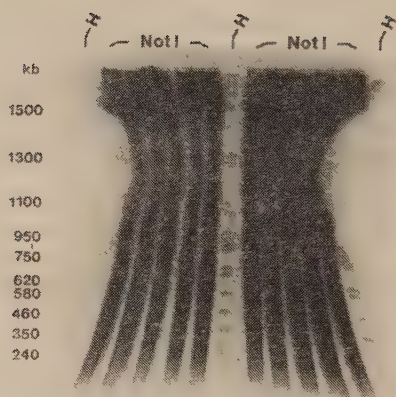
Eine andere Möglichkeit, die sich zur Strukturanalyse von Immunglobulingen-Loci anbietet, ist die Deletionskartierung. Bei Umlagerungen der Gene nach dem Deletionsmechanismus werden die DNA-Bereiche zwischen den zusammengeschalteten Gensegmenten eliminiert (14,15). Diese Deletionen lassen sich in der DNA von Zelllinien, deren Immunglobulingene nach diesem Mechanismus umgelagert wurden, nachweisen. Aufgrund solcher Untersuchungen konnten bisher Aussagen über die Anordnung der V_B-Segmente des menschlichen T-Zellrezeptors (74), über die Struktur des V_H-Locus bestimmter Mäusestämme (75) und sehr eingeschränkte Aussagen über die Organisation der V_K-Genfamilien der Maus (30) gemacht werden. Da zum einen große Teile des menschlichen K-Locus dupliziert sind (34,35,36,76) und zum anderen die Genseg-

mente nicht nur nach dem Deletions- (14,15), sondern auch nach dem Inversionsmechanismus (27,28) umgelagert werden können (3.4.), führten Deletionsanalysen hier nur zu Aussagen über die B-Region (3.4.1), nicht über die duplizierten Bereiche (37,77).

Schließlich bot sich eine neue Methode, die Pulsfeld-Gelelektrophorese (PFG) an, die in Verbindung mit selten schneidenden Restriktionsnukleasen besonders geeignet ist, große DNA-Bereiche zu kartieren (40,41).

2.3.1. Auswahl geeigneter Systeme und Bedingungen für die Pulsfeld-Gelelektrophorese

Das erste dieser Elektrophoresesysteme wurde 1982 von Schwartz und Cantor (78,79) als "Pulsed Field Gradient Electrophoresis" vorgestellt. Hierbei wurde in Zeitintervallen von 2 bis 100 s zwischen einem homogenen und einem inhomogenen elektrischen Feld umgeschaltet. Eine Variation dieses Prinzips stellt die "orthogonal field alternation"-Gelelektrophorese (OFAGE) von Carle und Olson (80) dar, bei der beide Felder inhomogen sind. Sie wurde in der Arbeitsgruppe durch B. Straubinger etabliert (59). Diese Methode liefert zwar eine gute Auftrennung in allen Molekulargewichtsbereichen, ihr Nachteil liegt jedoch in der starken Verzerrung besonders der äußeren Spuren des Gels (Abb.13a). Dadurch wird die Größenbestimmung der hybridisierenden DNA-Fragmente z.T. sehr ungenau. Bei kürzeren Pulszeiten, d.h. bei der Auftrennung kleinerer Fragmente ist dieser Effekt weniger stark ausgeprägt. Bei der ebenfalls von Carle und Olson (81) entwickelten Feld-Inversions-Gelelektrophorese (FIGE) wird die Verzerrung dadurch verhindert, daß sich zwei homogene Felder, die in einem Winkel von 180° zueinander liegen, abwechseln. Um eine möglichst lineare Abhängigkeit der Wanderungsstrecke der DNA von ihrem Molekulargewicht zu erhalten, sind die Pulszeiten in einer Feldrichtung dreimal so lang wie in der anderen und nehmen während der Elektrophorese linear zu. Wie Abb.13b zeigt, werden die DNA-Spuren zwar weniger verzerrt, aber zum einen werden die Banden bei größeren Molekulargewich-



13c) CHEF

Abb.13: Vergleich dreier PFG-Elektrophoresesysteme

Abb.13a zeigt die Auftrennung NotI-gespaltener PC-3-DNA und Hefechromosomen des Wildtypstammes #140 (4.2.) mit Hilfe der "orthogonal field alternation"-Gelelektrophorese (OFAGE, Ref.80). Die Größen der Hefechromosomen (H) wurden entsprechend 4.8.2. bestimmt und sind in kb angegeben. Die Elektrophorese lief 42 h bei einer Pulszeit von 100 s.

Abb.13b zeigt die Auftrennung gespaltener PC-3-DNA neben Hefechromosomen (H) und Oligomeren des Phagen λ (λ) mit Hilfe der Feld-Inversions-Gelelektrophorese (FIGE, Ref.81). Die zur Spaltung der DNA verwendeten Enzyme sind über den Spuren, die Größen der Hefechromosomen neben dem Ethidiumbromidbild angegeben. Die Schaltintervalle in Vorwärts- und Rückwärts-Laufrichtung wurden wie folgt gewählt: vorwärts eine lineare Zunahme von 9 s auf 60 s innerhalb von 16 h; rückwärts eine lineare Zunahme von 3 s auf 20 s innerhalb 16 h. Die Spannung betrug 250 V.

In Abb.13c ist eine Auftrennung mit Hilfe der CHEF-Elektrophorese (contour-clamped homogeneous electric field, Ref.82) dargestellt. Hefe-, λ - und gespaltene PC-3-DNA wurden 41 h bei einer Pulszeit von 80 s aufgetrennt.

ten unscharf, und zum anderen ist dieses System sehr empfindlich gegen Überladung des Gels. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde schließlich noch eine weitere PFG-Variante getestet, die "contour-clamped homogeneous electric field"-Elektrophorese (CHEF) nach Ref.82. Wieder wird zwischen zwei homogenen elektrischen Feldern umgeschaltet, die hierbei in einem Winkel von 120° zueinander liegen. Sie werden erzeugt durch Elektroden, die über Widerstände miteinander verbunden sind. Allerdings ist auch hier der Bereich ohne Verzerrungen auf wenige Spuren in der Gelmitte beschränkt (Abb.13c). Bei der Übersichtskartierung des K-Locus wurde die CHEF-Elektrophorese und besonders in Verbindung mit kurzen Pulszeiten auch OFAGE angewendet.

Aufgetrennt wurde mit Restriktionsnukleasen gespaltene DNA der Prostatakarzinom-Zelllinie PC-3 (Ref.64). Die DNA dieser Zelllinie ist relativ schwach methyliert (59), wodurch das Auftreten von Partialsplattungen aufgrund der Inhibierung methylierungssensitiver Restriktionsnukleasen gering gehalten wird. Weiterhin handelt es sich hierbei nicht um eine lymphoide

Zelllinie, d.h. die Immunglobulingene sind nicht umgelagert worden, und der K-Locus liegt in Keimbahnkonfiguration vor. Das vollständige Vorliegen des Locus war von B. Straubinger überprüft worden (59).

2.3.2. Lokalisierung der duplizierten Regionen auf zwei NotI-Fragmenten

B. Straubinger hatte gezeigt, daß spezifische Hybridisierungsklone aus den duplizierten Regionen A, O und L in NotI-gespaltener DNA zwei Fragmente erkennen, während die Probe aus der B-Region und die C_K-Probe nur mit dem größeren der beiden hybridisiert. Dies sprach dafür, daß ein großer Teil des K-Locus als Ganzes dupliziert ist und die zwei hybridisierenden NotI-Fragmente nicht auf Partialspaltung zurückzuführen sind.

Als Größen dieser zwei NotI-Fragmente wurden von B. Straubinger mittels OFAGE 1300 und 1000 kb ermittelt (83). Im Rahmen dieser Arbeit wurden sie nach Auftrennung mit CHEF-Elektrophorese zunächst mit 1200 und 900 kb bestimmt. Als für einen Vergleich von PC-3-DNA mit DNA aus vier Individuen sehr wenig DNA auf ein Gel aufgetragen wurde (Abb.17), wurden nur noch 1100 und 800 kb für die Größen dieser Fragmente gemessen. Aus diesen Abweichungen ist ersichtlich, wie sehr die Bestimmung der Größe von Restriktionsfragmenten mittels PFG-Elektrophorese von der auf das Gel aufgetragenen DNA-Menge abhängt. Detaillierte Experimente zur Größenbestimmung, bei denen zum einen dieser Effekt berücksichtigt wurde, und zum anderen als Größenmarker Hefechromosomen eingesetzt wurden, deren Größe genau bekannt war, wurden von G. Weichhold durchgeführt (84). Als Ergebnis seiner Versuche konnten die Größen der mit Proben aus dem K-Locus hybridisierenden NotI-Fragmente auf 1050 und 850 kb festgelegt werden. In der vorliegenden Arbeit wurden diese Zahlen verwendet.

Mit Hilfe präparativer PFG-Elektrophorese sollte nun gezeigt werden, welche der beiden Kopien der duplizierten Regionen jeweils auf einem dieser NotI-Fragmente miteinander gekoppelt

sind. Dazu wurde NotI-gespaltene DNA in hochreiner Agarose (4.6.3.) aufgetrennt und nach Isolierung aus dem Gel mit Restriktionsnukleasen gespalten, die eine Unterscheidung zwischen den jeweiligen Duplikaten ermöglichen (Abb.14). Aus Tab.2 ist ersichtlich, daß auf dem größeren NotI-Fragment, zusammen mit der B-C_K-Region (2.3.3.1.), die Ab- und die La-Kopie liegt, während auf dem kleineren Aa mit Lb gekoppelt ist.

Tabelle 2: Zusammenstellung der Hybridisierungsexperimente mit Proben, die zwischen den Duplikaten diskriminieren

Probe	Nachspaltung mit	Hybridisierende Fragment- größen in kb auf	
		1050 kb NotI	850 kb NotI
m237-1	BglII	15,6 (Ab)	5,6 (Aa)
m142-2	BglII/SacI	8,5 (Ab)	5,8 (Aa)
m656-1	BglII/SacI	-	1,9 (Aa)
m21-1	BglII	7,5	7,5
		6,7	6,7
			3,8 (Lb)
		2,9 (La)	
		2,4	2,4

Neben den hybridisierenden Fragmentgrößen ist in Klammern die Region angegeben, in der das jeweilige Fragment liegt.

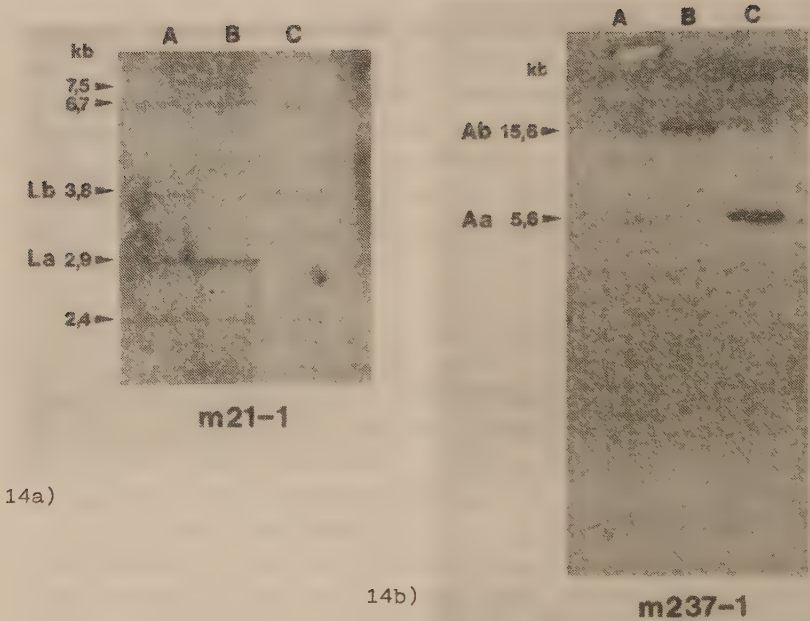


Abb.14: Hybridisierung isolierter NotI-Fragmente mit Proben spezifisch für die L- und A-Regionen

10 X 15 µg NotI-gespaltener PC-3-DNA wurden mittels OFAGE in einem 1 %igen Agarosegel (LMP Agarose, GIBCO BRL) aufgetrennt (Bedingungen wie in Abb.13a). Die Bereiche um 850 und 1050 kb wurden aus dem Gel ausgeschnitten, die DNA isoliert (4.8.3.), mit BglIII nachgespalten, über konventionelle Gelelektrophorese aufgetrennt und nach Transfer auf Membranfilter stringent hybridisiert.

In Abb.14a ist die Hybridisierung mit der für die L-Regionen spezifischen Probe m21-1 (Ref.34) dargestellt. Spur A, Plazenta-DNA (Indiv. AF); Spur B, NotI-Fragmente um 1050 kb; Spur C, NotI-Fragmente um 850 kb. Die Größen der hybridisierenden BglIII-Fragmente sind in kb angegeben.

Abb.14b zeigt die Hybridisierung mit der für die A-Regionen spezifischen Probe m237-1 (Auftragung wie in Abb.14a).

Mit Proben aus der O-Region war auf diese Weise keine eindeutige Zuordnung zu den anderen duplizierten Regionen möglich, da sich die entsprechenden Spaltstellenunterschiede zwischen den

Duplikaten bei verschiedenen Individuen ähnlich verhalten wie allelische Unterschiede (55).

Da nach Versuchen von B. Straubinger (59,83) die W-Regionen auf anderen NotI-Fragmenten liegen und auch bei weiteren Enzymen keine Übereinstimmung mit den anderen Regionen festzustellen waren, wurde angenommen, daß diese Regionen außerhalb des K-Locus lokalisiert sind. Weitere PFG-Experimente zu diesen Regionen wurden von F.-J. Zimmer durchgeführt (56).

2.3.3. Kartierung des K-Locus mit selten spaltenden Nukleasen

2.3.3.1. Zuordnung spezifischer Suchklone der einzelnen Regionen zu großen Restriktionsfragmenten

Erste Versuche zur Analyse der klonierten Regionen mit Pulsfeld-Gelelektrophorese waren von B. Straubinger unternommen worden (59). Daher lagen einige Daten über die Hybridisierung der für die verschiedenen Regionen spezifischen Proben mit großen Restriktionsfragmenten vor. Darauf aufbauend wurden im Rahmen dieser Arbeit zum einen die Elektrophoresebedingungen auf die jeweilige hybridisierende Fragmentgröße abgestimmt, d.h. für kleine Fragmente wurden kurze und für große Fragmente lange Pulszeiten gewählt (Abb.15). Zum anderen wurden Doppelspaltungen mit diesen Enzymen durchgeführt (4.7.). Um eine Aussage über die Kopplung bestimmter Regionen auf einem Restriktionsfragment machen zu können, wurden die entsprechenden Nylonmembranen mit mehreren Proben nacheinander hybridisiert. Nur so konnte entschieden werden, ob zwei Hybridisierungsklone Fragmente gleicher oder nur ähnlicher Größe erkennen. In Tab.3 sind die Ergebnisse sukzessiver Hybridisierungen von Einzelspaltungen und in Tab.4 von zweifach gespaltener PC-3-DNA zusammengefaßt. Abb.15 zeigt einige Spaltungen mit selten spaltenden Restriktionsnukleasen, die Stützpfeiler der in 2.3.3.3. beschriebenen Restriktionskarte des K-Locus darstellen.

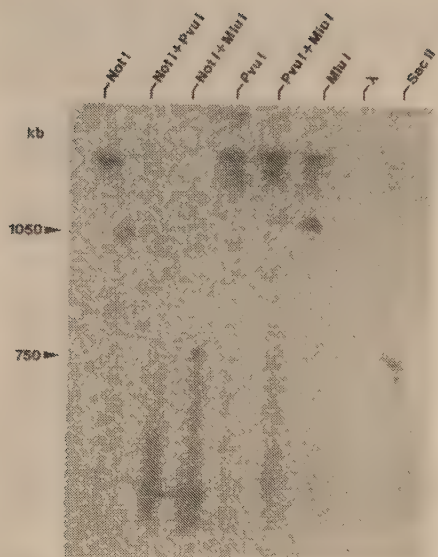
Tabelle 3: Hybridisierungen der mit jeweils einer Nuklease gespaltenen PC-3-DNA mit regionspezifischen Proben

Probe Region	NotI	MluI	PvuI	BssHII	SfiI	SalI	XhoI	ClaI
m217-1 Oa/Ob	1050 850	230	300	≥900 700	200	150	-	50
142-2 Aa/Ab	-	-	-	≥900 700	300 250	250 230	-	-
m659-2 Aa/Ab	1050 850	1100 420	(900) 500	-	300 250	250 230	150 50	200 100
m656-1 Aa	850	420	500	≥900 700	150	250	170	≤ 50
m5-5 Aa/Ab	-	-	-	-	300 150	250 230 150	170 150	100 70 30
m134-6 HK134	-	-	-	-	300 150	-	170 150	100 40
m21-1 La/Lb	-	-	≥700 500	≥900 700	300 150	130	-	-
m127-2 La/Lb	1050 850	1100 420	(900) 500	-	300 150	130	170 150	100
m111-7 B	1050	1100	-	≥600 300	250	220	50	90
pC-2 C _K	1050	1100	-	≥600 300	250	220	-	130

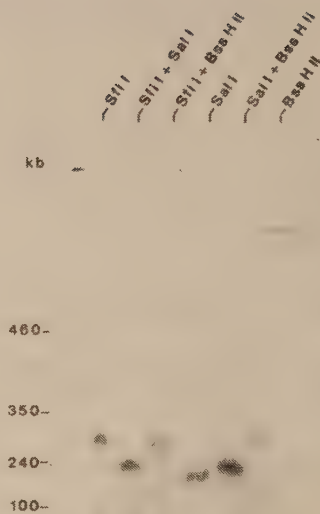
Der Klon m134-6 wurde von A. Meindl (67) aus dem von Bentley und Rabbitts (76) isolierten λ-Klon HK134 subkloniert. A. Meindl führte auch die Filterhybridisierung mit dieser Probe durch. m5-5 ist in Abb.5 und alle anderen Hybridisierungsklone sind in Abb.16 beschrieben. Fragmentgrößen, die bei Hybridisierung desselben Filters mit mehreren Proben hybridisierten, sind fettgedruckt.

Tabelle 4: Hybridisierungen ausgewählter Doppelspaltungen zur Kartierung der Fragmente im Größenbereich bis 300 kb

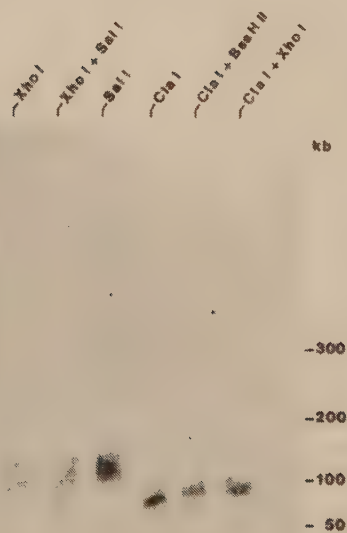
Probe Region	SfiI	SalI	XhoI	ClaI	SfiI SalI	XhoI SalI	SfiI BssHII	SalI BssHII
m217-1 Oa/Ob	200	150	-	50	150	-	200	150
142-2 Aa/Ab	300 250	250 230	-	-	250	-	300 250	250 230
m659-2 Aa/Ab	300 250	250 230	150 50	200 100	250	60	-	-
m656-1 Aa	150	250	170	50	70	60	150	250
m21-1 La/Lb	300 150	130	-	-	100	-	300 150	150
m127-2 La/Lb	300 150	130	170 150	100	-	130 110	-	-
m111-7 B	250	220	50	90	220	-	250	220
pC-2 C _K	250	220	-	130	220	-	250	220



15a)



15b)



15c)

Abb.15: Hybridisierungen gespaltener, hochmolekularer PC-3-DNA mit Proben, die für die B- und L-Regionen spezifisch sind

Abb.15a zeigt die Hybridisierung von gespaltener und mittels CHEF-Elektrophorese aufgetrennter PC-3-DNA mit dem Klon m111-7 (B-Region). Die Pulszeit bei der Elektrophorese über 41 h betrug 80 s. Die Größen der hybridisierenden NotI- und MluI-Fragmente sind in kb angegeben.

Für Abb.15b erfolgte die Auftrennung mit OFAGE für 37 h bei einer Pulszeit von 40 s. Die Größen der Markerfragmente sind in kb angegeben.

In Abb.15c ist die Hybridisierung von gespaltener und mit CHEF-Elektrophorese aufgetrennter DNA mit der Probe m127-2 (L-Region; Ref.65) dargestellt. Die Elektrophorese erfolgte 35 h bei einer Pulszeit von 30 s. Die Größen der λ -Oligomere sind am rechten Bildrand in kb angegeben.

2.3.3.2. Sind die auf Cosmiden lokalisierten Restriktionsspaltstellen auch in PC-3-DNA spaltbar?

Um die Ergebnisse der PC-3-DNA-Hybridisierungen interpretieren zu können, mußten die Spaltstellen der verwendeten Restriktionsenzyme in den klonierten Regionen lokalisiert werden. Für die Enzyme PvuI, SalI, XhoI und ClaI lagen diese Daten bereits vor, da sie bei jeder Cosmidcharakterisierung in der Arbeitsgruppe verwendet werden. Nachträglich wurde eine Reihe von Cosmiden, die jede Kopie der klonierten Regionen repräsentierten, mit den Nukleasen NotI, MluI, BssHII und SfiI kartiert. Dabei wurde neben den in Abb.16 eingezeichneten Spaltstellen je eine BssHII-Stelle in der La- und der B-Region lokalisiert, die in PC-3-DNA entweder nicht vorhanden oder nicht spaltbar ist. Da zum damaligen Zeitpunkt die B-Region noch nicht durch chromosomal walking mit der C_K -Region verbunden worden war (57), kam der BssHII-Stelle am 5'-Ende der B-Region (Abb.10) eine besondere Bedeutung zu. Mit ihrer Hilfe hätte sowohl der maximale Abstand zwischen C_K und dem ersten V_K -Segment bestimmt werden können, als auch die 5'-3'-Orientierung der in der B-Region liegenden V-Gene relativ zu C_K . Es bestand die Möglichkeit, daß diese Spaltstelle in PC-3-DNA durch Methylierung blockiert ist (85,86). Deshalb wurde versucht, durch Behandlung

der Zellen mit 5-Aza-Cytidin (1 μ M und 4 μ M im Medium, 4.12.) den Methylierungsgrad der DNA herabzusetzen (87) und damit die Spaltstelle zugänglich zu machen (88). Da in DNA aus so behandelten Zellen keine Änderung der hybridisierenden BssHII-Fragmentgröße eintrat, konnte die Frage, ob die BssHII-Erkennungssequenz in PC-3-DNA methyliert oder nicht vorhanden ist, nicht geklärt werden. Auch in DNAs aus MRC-5- und BL36-Zellen (4.3.) ließ sich diese Restriktionsspaltstelle nicht nachweisen. Bei allen anderen verwendeten Restriktionsnukleasen traten keine Diskrepanzen zwischen PC-3- und Cosmid-DNA auf.

2.3.3.3. Physikalische Karte und Minimalgröße des K-Locus

Mit Hilfe der auf Cosmiden lokalisierten Restriktionsspaltstellen und der vergleichenden Filter-Hybridisierungen mit den für die verschiedenen Regionen spezifischen Proben wurde eine Restriktionskarte der bisher klonierten Bereiche des K-Locus erstellt (Abb.16).

Der Abstand und die Orientierung der La-Region relativ zu Ab wurde mit Hilfe der XhoI-Spaltstellen in beiden Regionen festgelegt (Abb.15c). Die Orientierung von Lb relativ zu Aa konnte durch vergleichbare Spaltstellen nicht festgelegt werden. Es wurde angenommen, daß sich die Duplikate in diesem Punkt nicht unterscheiden. Der Abstand zwischen diesen beiden Regionen beruht auf den Spaltungen mit ClaI, SfiI und XhoI (Tab.3).

Aufgrund der von A. Meindl durchgeführten Hybridisierung von XhoI- und SfiI-gespaltener PC-3-DNA mit der Probe m134-6 (Tab.3, Ref.67) konnten die λ -Klone HK134 und HK137 (Ref.76), die je ein V_K -Gen enthalten und bisher nicht durch Cosmide repräsentierte Duplikate darstellen, zwischen den L- und A-Regionen lokalisiert werden.

Eine entscheidende Rolle bei der Konstruktion der Karte spielte die in der Ob-Region lokalisierte MluI-Stelle. Aufgrund der Verkleinerung des mit mehreren Proben hybridisierenden 1100 kb großen MluI-Fragmentes durch NotI (Abb.15a) konnte die

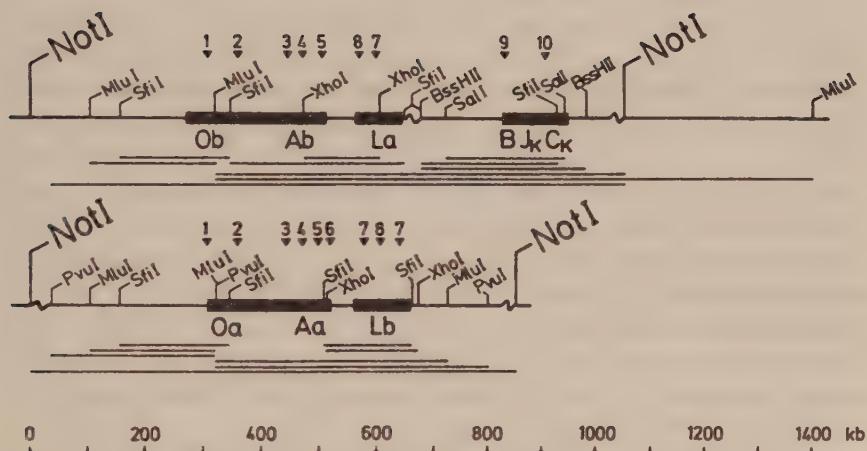


Abb.16: Übersichtskarte von zwei Teilen des K-Locus

Nur die Restriktionsspaltstellen, die zur Erstellung der Karten notwendig sind, wurden eingezeichnet. Mit den jeweiligen Proben hybridisierende Fragmente sind als horizontale Linien unter den Karten angegeben. Paare von geschwungenen Linien ($\sim$) bedeuten, daß die DNA-Stücke zwischen ihnen nach links oder rechts verschoben werden können. Die Unterbrechung in der A-Region wurde vernachlässigt. Die verwendeten Hybridisierungsklone sind als Dreiecke mit Nummern eingezeichnet, wobei die Nummern für folgende Klone stehen: 1, m217-1 (36); 2, m143-1 (36); 3, m142-2 (35); 4, m163-1 (35); 5, m659-2; 6, m656-1; 7, m21-1 (34); 8, m127-2 (65); 9, m111-7; 10, pC-2 (89). Klone, die im Rahmen dieser Arbeit konstruiert wurden, sind nicht mit einer Literaturangabe versehen.

Folgende Restriktionsspaltstellen wurden außerhalb der klonierten Bereiche mit Hilfe von PFG-Elektrophorese identifiziert, aber nicht in die Übersichtskarte eingezeichnet: je eine SalI- und ClaI-Stelle 20 kb 3' von Ab, je eine ClaI- und XhoI-Stelle 40 kb 5' der B-Region, zwei ClaI-Stellen direkt 5' und 3' der Lb-Region und eine SalI-Stelle 20 kb 3' von Lb.

B-C_K-Region 3' von La lokalisiert werden. Die Orientierung dieser Region relativ zu den V_K-Gene tragenden Regionen liegt durch die kartierten Restriktionsspaltstellen nicht fest. Daher wurde in Zusammenarbeit mit H.-G. Klobeck DNA eines Hybrids aus der Zelllinie JI und dem Maus-Myelom NP3 (Ref.57) mit der Probe 659-2 (A-Regionen, 2.2.1.4.) hybridisiert. Diese Hybridzelllinie enthält das 8q⁺-Chromosom der Zelllinie JI (90), welches das Resultat einer reziproken t(2;8) Translokation ist und die Region zwischen J_KC_K und dem Telomer von Chromosom 2, fusioniert mit Chromosom 8-Sequenzen enthält (91). Nachdem DNA dieser Hybridzelllinie nicht mit der für die A-Regionen spezifische Probe hybridisierte, mußten die duplizierten, V_K-Gene enthaltenden Regionen 5' von C_K liegen. Der genaue Abstand zwischen B und La konnte nicht bestimmt werden, da es unklar ist, ob es sich bei der SfiI-Stelle (3' von La), die von beiden Seiten her kartiert wurde, um ein und dieselbe oder um zwei verschiedene Schnittstellen handelt.

Aus der Karte ergibt sich, daß die in der Ob-, Ab- und La-Region liegenden V_K-Gene die gleiche Transkriptionsrichtung haben wie die J_K- und C_K-Segmente. Da die Orientierung des kleineren NotI-Fragmentes relativ zu dem größeren nicht festliegt, kann aufgrund dieser Daten allein keine entsprechende Aussage über die V-Segmente der Oa-, Aa- und Lb-Regionen gemacht werden (3.4.).

Auch die Bestimmung der Größe des K-Locus erhält durch die Tatsache, daß keine über beide NotI-Fragmente übergreifende Restriktionskarte erstellt werden konnte, eine Unsicherheit. Denn dadurch ist unklar, ob beide Fragmente im Genom direkt nebeneinander liegen, oder ob sich zwischen ihnen noch unbekannte DNA-Sequenzen befinden. Eine weitere Unsicherheit kommt hinzu durch Ungenauigkeiten bei der Größenbestimmung der hybridisierenden Fragmente. Zum einen beruhen die Ungenauigkeiten auf der Abhängigkeit des Laufverhaltens der DNA von der auf das Gel aufgetragenen Menge (2.3.2.) und zum anderen auf der Verzerrung der Spuren bei der Elektrophorese, besonders bei OFAGE (Abb.13). Ordnet man die klonierten Regionen innerhalb der variablen Bereiche der Karte (Abb.16) mit dem kleinstmöglichen

Abstand voneinander an und setzt voraus, daß die beiden NotI-Fragmente direkt benachbart sind, dann beträgt der minimale Abstand zwischen C_K und dem am weitesten 5' liegenden V_K -Segment und damit die Minimalgröße des K-Locus 1,5 Mb.

2.3.4. Vergleich zwischen DNAs der Zelllinie PC-3 und vier nicht verwandter Individuen

Alle PFG-Experimente zur Konstruktion der Restriktionskarte des K-Locus wurden mit DNA aus der Prostatakarzinom-Zelllinie PC-3 (Ref.64) durchgeführt. Soweit es auf diesem Wege möglich war, hatte B. Straubinger durch Hybridisierung mit V_K -Genproben gezeigt, daß der K-Locus im Genom dieser Zellen vollständig enthalten ist (59). Um zu zeigen, daß die Übersichtskarte nicht nur für diese Zelllinie Gültigkeit hat, wurde hochmolekulare DNA aus peripheren Leukozyten von vier verschiedenen Individuen isoliert (4.6.3.), mit den Enzymen NotI und BssHII gespalten und neben PC-3-DNA aufgetrennt. Abb.17 zeigt die Hybridisierung der fünf mit NotI gespaltenen DNAs mit einer Probe, die beide O-Regionen erkennt. Die NotI-Fragmente bei den Individuen 4, 7 und 13 haben die gleiche Größe wie die in PC-3-DNA hybridisierenden. Auf die Tatsache, daß die NotI-Fragmente auf diesem Gel (Abb.17) kleiner erschienen als auf vorherigen, wurde bereits eingegangen (2.3.2.). Vermutlich hängt dieser Effekt damit zusammen, daß auf dieses Gel sehr wenig DNA aufgetragen wurde.

Bei der Hybridisierung von BssHII-gespaltener DNA aus Individuen 4, 7 und 13 mit der Probe m111-7 (B-Region) hybridisierte statt eines 300 kb-Fragmentes (Tab.3) nur in der Kompressionszone laufende DNA (>500 kb), was wahrscheinlich auf dem höheren Methylierungsgrad dieser DNAs beruht.

In NotI-gespaltener DNA aus Individuum 11 hybridisiert mit der Probe aus der O-Region an Stelle der beiden NotI-Fragmente von 1050 und 850 kb nur ein größeres Fragment. Das stimmt überein mit der Beobachtung, daß die DNA dieses Individuums nur die C_K -proximalen Kopien der duplizierten Regionen enthält, d.h. hier keine Duplikation von Teilen des Locus vorliegt (35,67).

Auch aus diesen Experimenten ergab sich also kein Hinweis darauf, daß der K-Locus der Zelllinie PC-3 prinzipiell anders organisiert ist als der von Individuen, bei denen große Teile des Locus dupliziert sind.

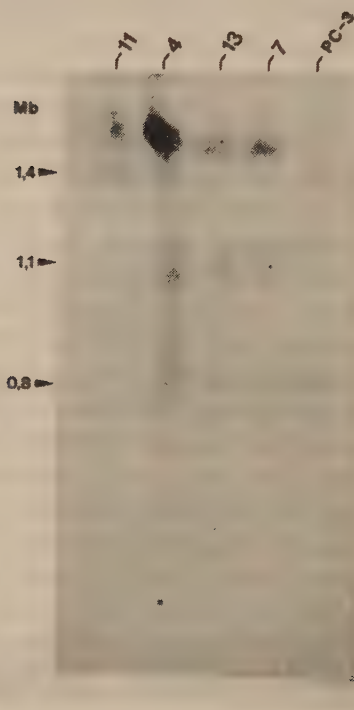


Abb.17: Hybridisierung NotI-gespaltener DNA aus verschiedenen Individuen mit einer für die O-Regionen spezifischen Probe

Je 10 µg DNA aus peripheren Leukozyten von vier verschiedenen Individuen (4, 7, 11 und 13 nach Ref.55) und aus der Zelllinie PC-3 wurden nach Spaltung mit NotI mit CHEF-Elektrophorese aufgetrennt (82 s Pulszeit, 42 h). Die Größen der mit der Probe 144-2 (Ref.36) hybridisierenden Fragmente sind in Mb angegeben.

3. Diskussion

3.1. Klonierung V_K -Gene enthaltender Genombereiche in Cosmiden

In der Arbeitsgruppe von Professor Zachau wurden große Teile des K-Locus in überlappenden λ -Phagen und Cosmiden kloniert (34-37,39). Einen Schwerpunkt der vorliegenden Arbeit stellten Strukturuntersuchungen an drei klonierten Abschnitten, den Regionen Aa, Ab und B, sowie deren Erweiterung durch chromosomal walking dar. Es war vor Beginn der vorliegenden Arbeit gezeigt worden, daß die B-Region einmal im menschlichen Genom vorliegt (37), während die A-Regionen wie die ebenfalls innerhalb des K-Locus lokalisierten L- und O-Regionen dupliziert sind (34,35,36).

Nach Restriktionskartierung und Zuordnung zweier Cosmide zur 3'-Seite der A-Regionen (2.2.1.1.) stellte sich heraus, daß in diesem Bereich die Homologie zwischen den Duplikaten Aa und Ab abbricht (2.2.1.2., Abb.2). Zunächst wurde vermutet, daß dieser Homologieabbruch zwei "Enden" der duplizierten Teile des K-Locus darstellt. PFG- und Hybridisierungsexperimente zeigten jedoch, daß dies nicht der Fall ist, sondern daß die 3' anschließenden Bereiche wieder homolog zueinander sind. Es handelt sich hier um einen lokal begrenzten Unterschied zwischen den Duplikaten. Ob dieser Unterschied auf eine Insertion in die Aa-Region oder auf eine Deletion in der Ab-Region zurückzuführen ist, konnte nicht geklärt werden. Da keine der A-Regionen in 3'-Richtung extendierenden Cosmide erhalten wurden, konnte die exakte Größe der Insertion, bzw. Deletion nicht ermittelt werden. Sie beträgt mindestens 13 kb (klonierter Bereich); aus PFG-Daten resultiert eine maximale Größe von 40 kb.

Zu Beginn der eigenen Arbeiten stellten die A-Regionen klonierte "Inseln" von 110 bzw. 70 kb mit insgesamt 20 V_K -Genen dar (59). Durch Extension der Region Ab in 5'-Richtung konnte sie an die Ob-Region angeschlossen werden (2.2.1.5.). Durch weitere Versuche von W. Pargent wurde auch die Aa-Region mit Oa verbunden (55). Abgesehen von einer Lücke innerhalb von Ab (Abb.7) sind damit zwei Genombereiche von je 250 kb zusammen-

hängend kloniert (Abb.16), wobei nach Daten von A. Meindl die in der Lücke zu erwartenden V_K -Gene A19 und A20 in genomischer DNA tatsächlich vorhanden sind (67). Bemerkenswert ist, daß alle innerhalb dieser Bereiche lokalisierten V_K -Gene die gleiche Transkriptionsrichtung haben und Gene aus verschiedenen Subgruppen in zufälliger Abfolge vorliegen. Die Entstehung dieser gemischten Anordnung von V_K -Genen im Laufe der Evolution läßt sich durch einfache Amplifikationen aufgrund von ungleichem Cross-over nicht erklären, sondern es müssen auch Transpositionseignisse angenommen werden (92). Hierfür muß man allerdings entweder einen Mechanismus postulieren, der Insertionen nur in einer 5'-3'-Richtung zuläßt, oder es muß angenommen werden, daß gegenläufig inserierte V-Segmente nicht umgelagert werden und daher aufgrund fehlenden Selektionsdrucks so stark divergiert sind, daß sie bei Hybridisierung von Cosmiden mit V_K -Proben nicht gefunden werden.

Nach Anschluß der A- an die O-Regionen erfolgten mehrere Extensionsversuche der A-Regionen in 3'-Richtung (2.2.1.4.). Da zunächst zwei Cosmidbanken ohne Erfolg abgesucht worden waren, die unter Verwendung des Enzyms Sau3A zur Partialspaltung der humanen DNA konstruiert worden waren (51,56), lag die Vermutung nahe, daß diese Regionen aufgrund einer nicht statistischen Verteilung der Sau3A-Spaltstellen in genomischer DNA in den Cosmidbanken unterrepräsentiert waren. Aus diesem Grund wurden im Rahmen der vorliegenden Arbeit zwei weitere Cosmidbanken konstruiert (2.1.), wobei für die Partialspaltungen zwei Restriktionsnukleasen verwendet wurden, die in der Arbeitsgruppe vorher nicht (BglII) oder nur einmal (MspI) zur Erstellung von Genbanken eingesetzt worden waren. Außerdem hatte H.-G. Klobeck durch Spaltung genomischer DNA mit HindIII eine Genbank in einem anderen Cosmidvektor (Lorist 2, Ref.93) konstruiert. Neben den mit Sau3A und BglII konstruierten Cosmidbanken wurde auch die HindIII-Bank mit Proben aus der 3'-Seite der A-Regionen abgesucht, bevor W. Pargent dieselben Suchklone zum Absuchen der MspI-Bank einsetzte (55). Keiner dieser Extensionsversuche führte zum Erfolg, es wurden bestenfalls Cosmide

isoliert, die in bereits klonierten Bereichen lagen. Da vier verschiedene Restriktionsnukleasen zur Konstruktion der Banken verwendet wurden, ist eine ungleichmäßige Verteilung oder unterschiedliche Zugänglichkeit der Restriktionsspaltstellen in genomischer DNA als Grund für eine Unterrepräsentation der gesuchten Bereiche unwahrscheinlich. Vielmehr scheint es so zu sein, daß bestimmte Regionen des menschlichen Genoms sehr schlecht oder gar nicht in Cosmiden klonierbar sind. Das kann daran liegen, daß diese Regionen sehr rekombinogen sind und deshalb in einer Bakterienzelle nicht stabil vermehrt werden können. Oder sie enthalten möglicherweise Sequenzen, die mit dem Stoffwechsel der Wirtszelle interferieren, z.B. indem diese Sequenzen in den Zellen exprimiert werden und die Genprodukte das Bakterienwachstum teilweise oder vollständig hemmen. Eine schlechte Klonierbarkeit bestimmter Genombereiche in Cosmiden wurde auch von anderen Arbeitsgruppen beschrieben (74,94,95).

Die einzige Möglichkeit dies zu umgehen, wäre vermutlich das Ausweichen auf andere Vektorsysteme. Wenn die inkompatiblen Sequenzen relativ begrenzte DNA-Bereiche einnehmen, besteht die Möglichkeit, diese Stücke in λ -Phagen zu klonieren, denn das Phagen genom mit der inserierten menschlichen DNA wird in der Bakterienzelle erst dann vermehrt, wenn der Phage einen lytischen Zyklus einleitet und dadurch die Wirtszelle ohnehin zerstört. In anschließenden Schritten des chromosomal walking könnte dann wieder auf Cosmidvektoren zurückgegriffen werden.

Für den Fall, daß die gesuchten Genomabschnitte keine inkompatiblen Sequenzen enthalten, sondern aus anderen Gründen in Genbanken unterrepräsentiert sind, wurde ein Verfahren beschrieben, mit dem diese Abschnitte mit Hilfe von RecA-Protein und biotinylierten Suchproben in Genbanken angereichert werden können (96). Diese Methode hat allerdings den Nachteil, daß eine Genbank jeweils nur für einige wenige Suchklone konstruiert werden kann.

Eine weitere Möglichkeit ist die Klonierung großer DNA-Bereiche in künstlichen Hefechromosomen (YACs, Ref.97). Dieses Vektorsystem ermöglicht die gezielte Klonierung von Restrik-

tionsfragmenten bis zu einer Größe von mehreren hundert kb. Erfolge wurden damit z.B. bei der Klonierung eines Nematoden-Genoms erzielt, indem in Cosmiden schwer klonierbare Bereiche mit YACs Überbrückt wurden (95).

3.2. Nicht in die Subgruppen-Klassifikation passende V_K -Gene

Von den innerhalb der A-Regionen lokalisierten V_K -Genen wurde in dieser Arbeit das Gen A14 genauer untersucht. Hybridisierungsexperimente (2.2.1.3.) und Sequenzanalysen (61) ergaben, daß dieses Gen zu einer Gruppe von drei bis vier V_K -Genen gehört, die sich nicht ohne weiteres einer der V_K -Subgruppen zuordnen lassen.

Die Untersuchung der Hybridisierungseigenschaften (2.2.3.1.) und die Sequenzierung (71) des Gens B1 aus der B-Region (72) zeigte, daß dieses V_K -Gen einen Vertreter einer aus zwei oder wenig mehr Mitgliedern bestehenden Gruppe von Genen darstellt, die ebenfalls nicht in die Subgruppen-Klassifikation passen.

Für solche divergenten V_K -Genfamilien wird allerdings zum jetzigen Zeitpunkt nicht die Definition neuer Subgruppen vorgeschlagen. Eine endgültige Klassifizierung sollte erst dann erfolgen, wenn alle menschlichen V_K -Gene bekannt sind (61).

Bei der Bestimmung der Anzahl der V_K -Gene durch Hybridisierungsversuche, wie sie von A. Meindl innerhalb der Arbeitsgruppe durchgeführt wurden (67), sind von den vier Subgruppen abweichende V_K -Gene von besonderem Interesse. Denn bei diesen Experimenten besteht die Gefahr, daß einige V_K -Segmente bei der quantitativen Analyse nicht erfaßt werden, weil sie aufgrund ihrer Divergenz von den eingesetzten Hybridisierungsproben nicht erkannt werden. Ein Beispiel für diesen Fall stellt das Gen B2 dar, das nur durch Hybridisierung mit einem Klon, der dieses Gen selbst enthielt, innerhalb der B-Region lokalisiert werden konnte (2.2.3.2.). Für das Gen B2 war zunächst eine neue

V_K-Subgruppe mit nur einem Mitglied postuliert worden (73), später wurde es aufgrund formaler Kriterien der Subgruppe III zugeordnet (9).

3.3. Implikationen der Übersichtskarte für weitere Klonierungsversuche im Bereich des K-Locus

Den zweiten Schwerpunkt dieser Arbeit stellte die Kartierung der klonierten Bereiche des K-Locus mit selten spaltenden Restriktionsnukleasen und PFG-Elektrophorese dar (2.3.). Bis auf eine Ausnahme konnten die Abstände zwischen den bisher klonierten Bereichen bestimmt werden (Abb.16). Daraus ergibt sich die Größe der Lücken, die zur vollständigen Klonierung des gesamten Locus noch zu schließen wären. Den größten noch fehlenden Bereich innerhalb der beiden NotI-Fragmente stellt mit 150 kb die Lücke zwischen der La- und der B-C_K-Region dar. Die Größen der Lücken zwischen den A- und L-Regionen und innerhalb der Ab-Region betragen 20 bis 40 kb. Sie könnten theoretisch durch einen Cosmidklon überbrückt werden. Allerdings wurde mehrmals erfolglos versucht, diese Bereiche in Cosmiden zu klonieren (3.2., Ref. 55,56,65). Hier würde sich die Klonierung der noch fehlenden Sequenzen in YACs (97) anbieten, besonders für die 150 kb große Lücke zwischen der La- und der B-Region.

Ein erheblich größeres Problem stellt in diesem Zusammenhang der Bereich zwischen den NotI-Fragmenten dar, zumal nicht bekannt ist, wie groß der Abstand zwischen den Fragmenten ist. Der Genomabschnitt, der bisher nicht kloniert wurde, erstreckt sich über mindestens 450 kb, kann aber wesentlich größer sein (2.3.3.3.). Um dies abzuschätzen, werden in der Arbeitsgruppe PFG-Experimente durchgeführt, in denen bei sehr langen Pulszeiten (98,99) durch Partialspaltungen erzeugte Fragmente von mehreren Mb Größe aufgetrennt werden (84). Aus diesen Versuchen sollte hervorgehen, ob die Größe des K-Locus weit über der in dieser Arbeit bestimmten Minimalgröße von 1,5 Mb liegt und ob

die Klonierung des Bereichs zwischen den duplizierten Blöcken in künstlichen Hefechromosomen Aussicht auf Erfolg hat. Für die sukzessive Klonierung in Cosmiden ist er voraussichtlich zu groß. Möglicherweise ist für die durchgehende Kartierung des gesamten K-Locus die Konstruktion von Hybridisierungsproben mit Hilfe des "chromosomal jumping" (100), welches das Überspringen von mehreren hundert kb ermöglicht, erforderlich.

3.4. Wie werden die V-Gene des K-Locus umgelagert ?

Je nachdem, in welcher Polarität V-Segmente relativ zu den J-Segmenten angeordnet sind, werden für die V-J-Umlagerung verschiedene Mechanismen diskutiert. V_K -Segmente mit der gleichen Transkriptionsrichtung wie die J_K -Segmente können entweder durch einen Deletionsmechanismus (15,31) oder durch Schwesterchromatidaustausch (32,33) umgelagert werden. Bei der Aktivierung eines V_K -Segmentes durch Schwesterchromatidaustausch würde ein Chromatid mit dem an ein J-Segment umgelagerten V-Segment und ein Chromatid mit dem reziproken Rekombinationsprodukt aus den Flanken der beiden Segmente (f-Fragment, 29,30) entstehen. Bei der darauffolgenden Mitose würden die Chromatide segregieren, d.h. in der Zelle mit dem umgelagerten V-Segment würde man kein f-Fragment finden. Es kann also nicht entschieden werden, ob in einer Zelle, die kein f-Fragment enthält, durch Deletion oder Schwesterchromatidaustausch umgelagert wurde. Da bisher keine Hinweise für Umlagerungen durch Schwesterchromatidaustausch gefunden wurden und Umlagerungen durch Deletion in Modellsystemen für V_K - J_K -Rekombination (101,102) gezeigt wurden, ist anzunehmen, daß gleichsinnig wie die J_K -Segmente orientierte V_K -Segmente durch einen Deletionsmechanismus umgelagert werden.

Die J_K -proximalen Gene B2 und B3 (3.4.1.) und ein V-Segment im Locus für die β -Kette des T-Zellrezeptors (103) sind Beispiele dafür, daß in Immungenloci auch invertierte V-Segmente

vorkommen. Sie müssen durch Inversion umgelagert werden, da bei Umlagerung invertierter V-Segmente durch Schwesterchromatidaustausch ein Chromosom mit zwei Zentromeren und eines ohne Zentromer entstehen würde.

In Versuchen mit Modellsystemen für V_K - J_K -Rekombination (101,102) wurde gezeigt, daß Umlagerungen sowohl durch Deletionen als auch durch Inversion stattfinden können. Nach der Umlagerung eines V-Segmentes an ein J-Segment durch Inversion muß in der Zelle neben der V-J-Verknüpfung ein f-Fragment auftreten. In mehreren lymphoiden Zelllinien mit V-J-Verknüpfungen wurden f-Fragmente nachgewiesen (29,30,73,104). Allerdings können f-Fragmente auch als Folge von Umlagerungen durch Schwesterchromatidaustausch erklärt werden. Zwar segregieren hier die V-J-Verknüpfung und das zugehörige f-Fragment bei der an die Umlagerung anschließenden Zellteilung, aber nach mehreren aufeinanderfolgenden Umlagerungen können auch in diesem Fall f-Fragmente in Zellen mit V-J-Verknüpfungen auftreten.

Die deutlichsten Hinweise auf Umlagerungen durch Inversion stellen daher Zelllinien dar, in denen f-Fragmente gefunden wurden, die zu den an J umgelagerten Sequenzen reziprok sind (28,105). Hier kann Schwesterchromatidaustausch mit hoher Wahrscheinlichkeit ausgeschlossen werden.

Eine weitere Möglichkeit, das Auftreten von f-Fragmenten in Zellen mit einer V-J-Verknüpfung zu erklären, ist Reintegration des bei Deletion auftretenden zirkulären Zwischenprodukts (106). Die Lokalisierung eines f-Fragments auf Chromosom 2 (Ref.107) macht diesen Vorgang unwahrscheinlich, da die Reinsertion des ausgeschnittenen DNA-Stückes zufällig in irgendein Chromosom erfolgen sollte. (Auch in einer Maus-Zelllinie wurde ein reziprokes Umlagerungsprodukt auf dem K-Locus-tragenden Chromosom lokalisiert, Ref.108)

3.4.1. Die V-J-Umlagerung der V_K -Segmente der B-Region

Die B-Region (Abb.10) stellt den einzigen klonierten Teil des K-Locus dar, in dem V-Segmente in gegenläufiger Orientierung vorliegen. Die Tatsache, daß die Gene B2 und B3 in lymphoiden Zelllinien mehrfach in umgelagerter Form gefunden wurden (37,73), hatte vermuten lassen, daß die B-Region J_K -proximal lokalisiert ist. Dies wurde durch PFG-Analyse (2.3.) und schließlich durch die Verknüpfung der B-Region mit der J_K - C_K -Region durch chromosomal walking (57) bestätigt. Dadurch war es hier erstmals möglich, konkrete Aussagen über die Umlagerung dieser V_K -Gene zu machen. Da die Gene B2 und B3 in entgegengesetzter Polarität zu den J_K -Segmenten angeordnet sind, müssen sie durch einen Inversionsmechanismus umgelagert werden. Mit der gleichen Orientierung wie J_K - C_K wird das Gen B1 durch Deletion der DNA zwischen V und J und damit Deletion der Gene B2 und B3 umgelagert.

Nachdem die Struktur der B- J_K - C_K -Region bekannt war, konnte die Entstehung eines in Ref.73 veröffentlichten Rekombinationsproduktes erklärt werden (72). Aus einer B-Zelllinie war ein Phagenklon isoliert worden, der 3' von einem aberrant an J_K1 umgelagerten Gen B3 ein f-Fragment aus einer J_K2 -Flanke und einer B2-Flanke enthält. Diese Konfiguration kann als das Produkt zweier aufeinanderfolgender Inversionen erklärt werden. Die Abfolge der Umlagerungsereignisse, die wahrscheinlich zur Bildung des beschriebenen Rekombinationsproduktes geführt haben, ist in Abb.18 dargestellt. Zuerst wurde das Gen B3 durch Inversion an J_K1 umgelagert. Das dabei entstandene f-Fragment (f1) ist nicht im sequenzierten Bereich enthalten. In einem zweiten Ereignis wurde das Gen B2 umgelagert. Als Folge dieser Inversion rückte die B3- J_K1 -Verknüpfung neben das f-Fragment aus der zweiten Umlagerung (f2). Diese Beobachtungen bestätigen, daß ein einzelnes K-Allel mehrmals umgelagert werden kann (105).

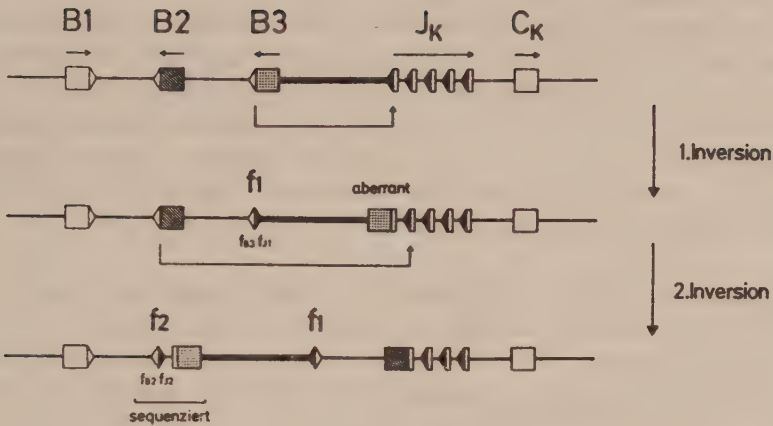


Abb.18: Zwei aufeinanderfolgende Inversionen in einer B-Zelllinie (73) führten zur Anordnung eines f-Fragmentes 3' von einem umgelagerten V_K -Gen

In der oberen Linie ist die Keimbahnkonfiguration dargestellt. Die zweite und die dritte Linie zeigen die Situation nach der ersten und zweiten Inversion. Die Transkriptionsrichtungen der Gensegmente sind durch Pfeile angegeben. Die Strecke zwischen B3 und J_K (23 kb, Ref.57) ist als dicke Linie eingezeichnet. Die Signalsequenzen für die Rekombinase sind als Dreiecke dargestellt. Ein Pfeil gibt jeweils die in einem Ereignis umgelagerten Gensegmente an. Die sequenzierte Region (73) ist mit einer Klammer versehen.

3.4.2. Umlagerung der V-Gene der duplizierten Regionen des K-Locus

Im Rahmen der Übersichtskartierung des K-Locus konnte gezeigt werden, daß die bisher klonierten Abschnitte des Locus auf zwei großen NotI-Fragmenten liegen (Abb.16). Auf dem größeren (1,05 Mb) wurde neben der singulären B- J_K - C_K -Region je eine Kopie der O-, A- und L-Regionen lokalisiert, während deren Duplikate dem 0,85 Mb großen NotI-Fragment zugeordnet wurden.

Es konnte zwar keine über beide NotI-Fragmente übergreifende Restriktionskarte erstellt werden, aber innerhalb des 1,05 Mb-Fragmentes liegen die 5'-3'-Orientierungen der klonierten Regionen fest. Bis auf die beiden J_K -proximal gelegenen V_K -Gene der B-Region (3.4.1.) haben alle bisher auf diesem NotI-Fragment lokalisierten V_K -Segmente die gleiche Transkriptionsrichtung wie die J_K -Segmente. Daher ist anzunehmen, daß sie durch einen Deletionsmechanismus umgelagert werden (Abb.19).

Aufgrund der Restriktionskarte allein liegt die Orientierung der V_K -Segmente auf dem 0,85 Mb großen NotI-Fragment relativ zu J_K - C_K nicht fest, da zum einen die Orientierung der NotI-Fragmente relativ zueinander offen ist und zum anderen die genaue Lage und Orientierung der klonierten Bereiche innerhalb dieses NotI-Fragmentes nicht bestimmt werden konnte. Aufgrund der oben diskutierten mechanistischen Überlegungen wird angenommen, daß ein Teil der V_K -Segmente durch Inversion umgelagert wird und somit eine zu J_K - C_K invertierte Polarität aufweist. Hierbei muß es sich um die auf dem kleineren NotI-Fragment lokalisierten V-Segmente handeln.

Es ist durchaus biologisch sinnvoll, wenn die Mehrzahl der C_K -proximalen V_K -Gene durch Deletion und die C_K -distalen V-Segmente durch Inversion umgelagert werden:

Ein Teil der Antikörperdiversität beruht darauf, daß z.B. die V_K - J_K -Verknüpfungsstellen variabel sind. Diese Flexibilität hat zur Folge, daß ein Teil der V-J-Umlagerungen aufgrund von Rasterschüben nicht funktionell ist. Die schlechte Effizienz des Umlagerungsmechanismus wird dadurch ausgeglichen, daß ein Allel die Möglichkeit hat, mehrmals umzulagern. Da der Locus fünf J_K -Segmente enthält, kann theoretisch fünfmal nacheinander umgelagert werden. Würde beim ersten Versuch ein weit 5' liegendes V-Gen durch Deletion umgelagert, dann gingen dabei sehr viele V_K -Gene verloren und das V-Genrepertoire für weitere Umlagerungen wäre stark eingeschränkt. Sind die Gensegmente so angeordnet wie in Abb.19 dargestellt, dann werden die C_K -distalen V-Gene durch Inversion umgelagert. Dabei bleiben alle Gene

des Locus erhalten. Nur die C_K -proximalen V_K -Gene lagern durch Deletion um, wobei die Duplikate der deletierten V-Gene erhalten bleiben. Diese Struktur des K-Locus würde also auch für mehrere aufeinanderfolgende Umlagerungsereignisse ein großes V-Genrepertoire garantieren.

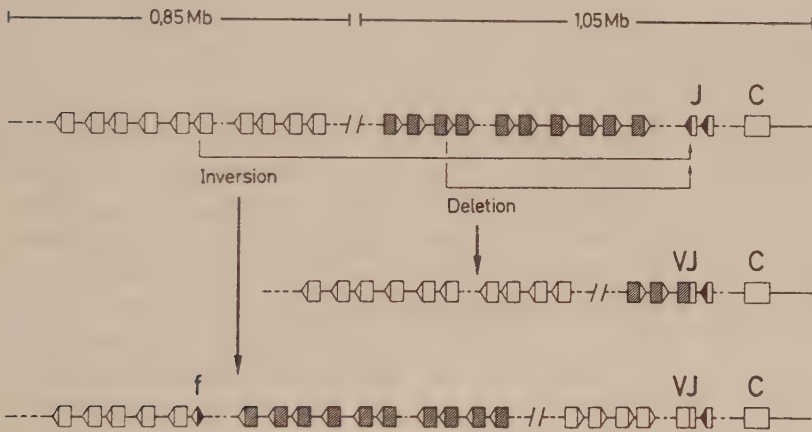


Abb.19: Schematische Darstellung der Umlagerung von V-Segmenten aus dem K-Locus durch Deletion oder Inversion

Die NotI-Fragmente, auf denen je ein Duplikat lokalisiert ist, sind oben angedeutet. Die invertierten V_K -Gene des 0,85 Mb-Fragments sind durch offene Kästchen, die gleichsinnig wie J_K - C_K orientierten Gene sind schraffiert dargestellt. Nur ein Teil der V- und nur zwei der fünf J-Segmente wurden eingezeichnet. Die Signalsequenzen für die Rekombinase sind durch Dreiecke dargestellt.

4. Materialien und Methoden

4.1. Chemikalien und Enzyme

Bactoagar und Bactotrypton wurden von Difco, Detroit, USA bezogen. Hefe-Extrakt lieferte die Firma Merck, Darmstadt. Alle organischen und anorganischen Reagenzien, die nicht gesondert aufgeführt sind stammten ebenfalls von Merck, Darmstadt. SeaKem Agarose und Seaplaque Agarose lieferte Marine Colloids, Rockland, USA, LMP Agarose die Firma GIBCO BRL GmbH, Eggenstein und Agarose TypII Sigma GmbH, Deisenhofen. Ampicillin ("Amblosin") wurde von der Bayer AG, Leverkusen bezogen. N-Lauroylsarkosin (Na-Salz), SDS und Dextran (MG 200 000) waren Produkte der Firma SERVA, Heidelberg. RNase A, Rinderserumalbumin (BSA), 5-Bromo-4-Chloro-3-Indolyl- β -D-Galaktopyranosid (X-Gal), 5-Azacytidin und Polyvinylpyrrolidin stammten von Sigma, Deisenhofen. Die radioaktiven Nukleotide (α - 32 P)dATP, (α - 32 P)dCTP und die Nylonmembranen GeneScreen und GeneScreen plus wurden von New England Nuclear (NEN), Dreieich bezogen, Desoxyribonukleotide, Tris und Isopropyl- β -D-Thiogalaktopyranosid (IPTG) von Boehringer, Mannheim. Ficoll 400 und Sephadex G50 stammten von Pharmacia GmbH, Freiburg.

Alle verwendeten Restriktionsnukleasen stammten von Boehringer, Mannheim, mit Ausnahme von BssHII, NotI, SfiI und SacII, die von New England Biolabs, Beverly, USA geliefert wurden. Ebenfalls von Boehringer, Mannheim kamen alkalische Phosphatase (Kälberdarm), Desoxyribonuklease I (Rinderpankreas), DNA-Polymerase (E. coli, Kornberg) und T4-DNA-Ligase. Proteinase K und Lysozym wurden von SERVA, Heidelberg bezogen. Extrakte für die in vitro-Verpackung, GigapackTM Gold stammten von GENOFIT GmbH, Heidelberg.

4.2. Bakterienstämme, Vektoren und DNAs

Der Bakterienstamm *E. coli* JM103 (Δ lac, pro, thi, strA, supE, endA, sbcB15, hsdR4, F' traD36, proAB, lacI^q, SAM15) wurde von P.L. Biochemicals, Milwaukee, USA geliefert. G. Hobom stellte den Stamm *E. coli* 490A (r_K , m_K , met⁻, thr⁻, leu⁻, recA⁻) zur Verfügung (109). In den von P. Leder (110) entwickelten Stamm *E. coli* LE392 (supE, supF, m_K , r_K , met⁻, trpR, gal⁻) wurde in vitro verpackte λ -DNA (cI857 Sam7) eingebracht.

Die M13-Vektoren mp7, mp8, mp9, mp10 und mp11 wurden von P.L. Biochemicals, Milwaukee, USA bezogen. Die pHC79-DNA, pBR322-DNA und λ -DNA (cI857 Sam7) stammte von Boehringer, Mannheim, *E. coli*- und Lachsspermien-DNA von Sigma GmbH, Deisenhofen. Plazenta-DNA (Individuum AF) war von A. Meindl und R. Mocikat präpariert worden, menschliche DNAs aus dem Blut verschiedener, nicht verwandter Individuen von W. Pargent (55).

Präparationen chromosomaler Hefe-DNA (PFG-Größenmarker) waren von E. Geigl, Gesellschaft für Strahlen- und Umweltforschung, Neuherberg, zur Verfügung gestellt worden. Es handelte sich um einen diploiden Wildtyp-Hefestamm (Laborbez. #140), der ursprünglich von P. Philippsen, Universität Gießen, stammte.

4.3. Kulturzellen

Die Prostatakarzinom-Zelllinie PC-3 (Ref.64) und die embryonalen Lungenfibroblasten MRC-5 (Ref.111) wurden von Flow Laboratories GmbH, Meckenheim bezogen und freundlicherweise von Prof. Fittler zur Verfügung gestellt. Die lymphoide Zelllinie BL36 (Ref.66) wurde von H.-G. Klobeck zur Verfügung gestellt. MEM Dulbecco-Medium, fötales Kälberserum und Trypsin (2,5 %) stammten von Boehringer, Mannheim.

4.4. Genbanken, Cosmide und Hybridisierungsklone

Die Genbanken IIIId und IIIe waren von H.-D. Pohlenz konstruiert (51) und von F.-J. Zimmer ausplattiert (56) worden. Dazu war Plazenta-DNA (Individuum St) mit Sau3A partiell gespalten und in die BamHI-Stelle der Vektoren pHC79 und pJB8 ligiert worden. Der Cosmidklon cos111 war von H.-D. Pohlenz kartiert (51) und zur Verfügung gestellt worden.

Tabelle 4: Hybridisierungsproben (V_K -Gene und -Teilbereiche)
für die Charakterisierung von Cosmiden und Subklonen
mit V_K -Genen

Klonbezeichnung	Subgruppe	Klonierter Bereich	Zitat
m1-3	I	L-FR3	(58)
m1-7	I	L'FR3	(*)
m1-4	I	L-Intron	(*)
m607-3	II	L'-FR3	(68)
m6410-13	II	L	(66)
m21-4	III	L-FR1	(112)
m41-7	III	FR1-FR3	(66)
m41-5	III	L-Intron	(66)
m41-3	III	5'L	(66)
mEV	III	L-CDR3	(73)

(*): Derivate von m1-3 (H.-G. Klobeck, unveröffentlicht)

4.5. Herstellung der Cosmidbanken V und VI

4.5.1. Präparation der Vektorarme

Für Cosmidbank V (mit BglII gesplattene Plazenta-DNA) wurden je 50 μ g pHC79-DNA in getrennten Ansätzen mit 200 U ClaI bzw. 200 U SalI 2 h bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde die Voll-

ständigkeit der Spaltung durch Elektrophorese in einem 0,8 %igen analytischen Agarosegel überprüft. Um die 5'-Phosphatgruppen abzuspalten wurden beide Ansätze mit 2,5 U alkalischer Phosphatase behandelt (30 min, 37°C), die Phosphatase anschließend mit Phenol inaktiviert und der Erfolg der Phosphatasebehandlung durch einen Ligierungstest mit T4-DNA-Ligase überprüft. Nachdem hierbei keine Oligomere auftraten wurden beide Ansätze mit 100 U BamHI (2h, 37°C) inkubiert, die Vektoranteile mit der cos-Region durch präparative Gelelektrophorese (4.8.3.) isoliert und ihre Ligierbarkeit getestet. Schließlich wurde die DNA phenolisiert, ethanolgefällt und in einem geeigneten Volumen 10 mM Tris, 10 mM EDTA, pH 8,0 aufgenommen.

Die Vektorarme für Genbank VI (mit MspI gesplattene Plazenta-DNA) wurden nach dem gleichen Schema hergestellt, wobei pHC79 mit SalI und PvuI linearisiert und die Klonierungsstelle mit ClaI freigelegt wurde.

4.5.2. Präparation und Größenfraktionierung genomischer Restriktionsfragmente aus Plazenta-DNA

Für Cosmidbank V wurde die nach 4.6.1. aus Plazenta N isolierte DNA mit BglII, für Cosmidbank VI mit MspI partiell gespalten. Zunächst wurden analytische Partialspaltungen mit 0,5 U Enzym pro µg DNA durchgeführt. Zu 15 verschiedenen Zeitpunkten (1 min bis 3 h) wurden Aliquots aus dem Ansatz entnommen und durch Phenolextraktion inaktiviert. Die Größe der Partialspaltungsprodukte wurde durch Elektrophorese in 0,3 %igen Agarosegelen mit λ-DNA und mit HindIII gesplattener λ-DNA als Längenstandard bestimmt. Unter entsprechenden Bedingungen wurden die präparativen Partialspaltungen mit BglII bzw. MspI mit jeweils 500 µg DNA durchgeführt und die Größe der Spaltungsprodukte sowie ihre Religierbarkeit überprüft. Die vereinigten Fraktionen der partialgespaltenen DNA wurden mit alkalischer Phosphatase behandelt (0,025 U/µg, 30 min, 37°C) und nach Phenolisierung und Ethanolfällung ihre Ligierbarkeit getestet. Die phosphatase-behandelte DNA wurde anschließend durch Dichtegradienten-

Zentrifugation größenfraktioniert. Hierfür wurde ein linearer Saccharosegradient (10-40 % Saccharose, 1M NaCl, 20 mM Tris, pH 8,0, 10 mM EDTA) verwendet (52). Die Auftrennung erfolgte für 20 h bei 26 000 rpm in einem Beckman SW27 Rotor. Die Größe der DNA in den einzelnen Fraktionen wurde auf 0,3 %igen Agarosegelen ermittelt. Fraktionen mit DNA im Größenbereich von 30 bis 50 kb wurden durch Ethanolfällung bei Raumtemperatur konzentriert und in 10 mM Tris, 10 mM EDTA, pH 8,0 aufgenommen.

4.5.3. Ligierung der Vektorarme mit größenfraktionierter DNA

Die Ligierung der Vektorarme an die größenfraktionierten Partialverdaufragmente erfolgte bei einer DNA-Konzentration von 300 ng/ μ l. Bei dieser DNA-Konzentration tritt bevorzugt die Bildung linearer Oligomere gegenüber der Zirkularisierung als Konkurrenzreaktion ein (113). Weiterhin wurden die Ligierungen bei einem molaren Überschuß an Vektorfragmenten gegenüber der zu klonierenden DNA (molares Verhältnis 6:1) durchgeführt. Die verschiedenen Fraktionen des Gradienten wurden getrennt ligiert und weiterbearbeitet. Es wurden jeweils 1,5 μ g größenfraktionierter DNA und 750 ng jedes Vektorarms in 10 μ l Gesamtvolumen bei 14°C für 15 h mit 1 U T4-DNA-Ligase inkubiert.

4.5.4. In vitro-Verpackung und Transfektion der rekombinanten Cosmidklone

Die in vitro-Verpackung der ligierten DNA mit Hilfe der Extrakte GigapackTM Gold erfolgte nach Herstellerangaben, wobei nicht mehr als 600 ng DNA pro Verpackungsreaktion eingesetzt wurde. Als Wirtsstamm wurde E. coli 490A verwendet. Der *recA*⁻-Status dieses Stammes wurde durch einen qualitativen Vergleich seiner UV-Sensitivität mit der des Stammes E. coli LE392 überprüft. Die Phagenrezeptoren wurden nach Ref.110 durch Aushungern der Zellen mit MgSO₄ induziert. Zur Adsorption der in vitro verpackten Cosmid-DNAs an die Rezipientenzellen wurde die Phagen-

suspension mit fünf Volumina der mit MgSO_4 behandelten Bakterien versetzt und 30 min bei 37°C inkubiert. Um die Ampicillin-Resistenz zu exprimieren wurde nach Zusatz von 20 Volumina LB-Medium (4.6.4.) weitere 60 min bei 37°C inkubiert. Mit der Zellsuspension wurden auf Ampicillin-Agarplatten ($100\text{ }\mu\text{g/ml}$ Ampicillin) aufgelegte Nylonmembranen (GeneScreen plus) beimpft. Dabei wurden die Titer so gewählt, daß 30 000 bis 50 000 Cosmidklone pro Membranfilter ($22 \times 22\text{ cm}$) nach Bebrüten bei 30°C erschienen.

4.5.5. Präparation der Koloniefilter und Anreicherung von Cosmidklonen

Für die Analyse von Cosmidbanken durch Koloniefilterhybridisierung wurde die Methode von Hanahan und Meselson (52,114) angewandt. Es wurden je zwei Replikafilter hergestellt und die Ursprungsfiler auf Agarplatten bei 4°C bis zu sechs Monate lang aufbewahrt. Die Lyse der Bakterienkolonien sowie die Denaturierung und Fixierung der DNA auf den Replikafiltern erfolgte nach Angaben von Benton und Davis (115). Nach Hybridisierung der Koloniefilter mit Suchklonen (4.10.) war in der Regel aufgrund der hohen Koloniedichte das jeweilige Hybridisierungssignal nicht eindeutig einer einzelnen Kolonie zuzuordnen. Es wurden daher alle Kolonien aus einem ca. 1 cm^2 großen Areal im Bereich des jeweiligen Hybridisierungssignals entnommen, in LB-Medium suspendiert und erneut ausplattiert. Von diesen Platten wurden nochmals Replikafilter hergestellt, die mit den jeweiligen Suchklonen hybridisiert wurden. Nach diesem Anreicherungsschritt war dann eine eindeutige Zuordnung der erhaltenen Hybridisierungssignale zu einzelnen Kolonien möglich.

4.6. Präparation von DNA

4.6.1. Präparation von DNA aus Plazenta

Für die Erstellung der Genbanken V und VI wurde DNA aus einer menschlichen Plazenta (Individuum N) nach der Methode von Blin und Stafford (53) isoliert. Dabei wurde die Zellyse in 0,5 M EDTA, pH 8,0 mit 0,1 mg/ml Proteinase K bei 50°C (ohne N-Lauroylsarkosin) und alle Dialysen gegen 50 mM Tris, 1 mM EDTA, pH 8,0 durchgeführt. Die DNA wurde nach der Reinigung nicht geschert, sondern ihre Größe auf einem 0,3 %igen Agarosegel mit λ -Oligomeren als Längenstandard bestimmt.

4.6.2. Präparation von DNA aus Kulturzellen

Die Proteinase K/SDS-Methode nach Ref.116 wurde modifiziert. Etwa 10^9 sedimentierte Zellen wurden in 10 ml PBS-Puffer suspendiert und durch SDS-Behandlung (0,5 % SDS, 10 mM Tris, 10 mM NaCl, 10 mM EDTA, pH 8,0) für 12 h bei 37°C lysiert und anschließend mit 100 μ g/ml Proteinase K behandelt. Nach zwei Phenol- und einer Chloroform-Extraktion wurde für 48 h bei 4°C unter mehrmaligem Pufferwechsel gegen 50 mM Tris, pH 8,0, 10 mM EDTA und 10 mM NaCl dialysiert. Nach Inkubation mit 50 μ g/ml RNase A wurde die Behandlung mit Proteinase K in Gegenwart von 0,5 % SDS sowie der anschließende Phenol- und Chloroform-Extraktionsschritt wiederholt und gegen TE-Puffer dialysiert. Die Einengung des Volumens erfolgte durch Dialyse gegen Butanol.

4.6.3. Präparation hochmolekularer DNA in Agarosematrix

Kulturzellen wurden nach Trypsinierung sedimentiert, mit PBS-Puffer gewaschen und mit PBS auf eine Konzentration von 2×10^7 Zellen/ml eingestellt. Diese Zellsuspension wurde 1:2 mit 1 %iger Agarose (IMP Agarose, BRL) in PBS verdünnt und in eisgekühlte Teflonschablonen gegossen. Die in Agarose eingebette-

ten Zellen wurden mit 1 mg/ml Proteinase K in 0,5 M EDTA (pH 9,5) und 1 % N-Lauroylsarkosin für 48 h bei 50°C behandelt und vor Spaltung der DNA mit Restriktionsnukleasen dreimal 5 h bei 4°C mit 10 mM Tris (pH 7,5), 10 mM EDTA und 0,1 mM PMSF gewaschen.

Um hochmolekulare DNA aus menschlichen Leukozyten zu präparieren wurden nach der in Ref.117 beschriebenen Vorschrift 10 ml Blut (EDTA ad 2,5 mM) mit 10 ml ACD-Lösung (2,1 % Glucose, 12,8 mM Tri-Na-Citrat, 5,7 mM Citronensäure, 3 % Dextran, 0,9 % NaCl) versetzt und 45 min bei Raumtemperatur inkubiert. Der Überstand (ohne Erythrozyten) wurde 10 min bei 450 g zentrifugiert und das Leukozytenpellet in 0,23 %iger NaCl-Lösung aufgenommen. Vor erneuter Zentrifugation wurde die NaCl-Konzentration auf 0,8 % erhöht. Die Behandlung mit 0,23 %iger NaCl-Lösung wurde zweimal wiederholt. Danach wurden die Zellen in PBS aufgenommen (2×10^7 Zellen/ml), 1:1 mit 1 %iger Agarose verdünnt und wie oben beschrieben lysiert und gewaschen.

4.6.4. Isolierung von Cosmid-, Plasmid- und M13-DNA

Cosmidklone, pBR322- und M13-Klone wurden über Nacht bei 37°C in LB-Medium (10 g/l NaCl, 10 g/l Trypton, 5g/l Hefeextrakt, Ref.62) angezogen. Zur Anzucht von pBR322-Klonen und Cosmidklonen in den Vektoren pHC79 und pJB8 wurde dem LB-Medium 100 µg/ml Ampicillin und zur Anzucht von Cosmiden in Lorist 2 (Ref.93) wurden 30 µg/ml Kanamycin zugegeben. Bei Plasmidisolierungen wurden in der mittleren log-Phase ($OD_{580} = 0,8$) Chloramphenicol (200 µg/ml) zugesetzt und über Nacht inkubiert. Zur Anzucht von M13-Klonen wurden E. coli JM103-Kulturen in der logarithmischen Phase ($OD_{580} = 0,5$) mit den jeweiligen M13-Phagen infiziert und 6-7 h bei 37°C geschüttelt. Die Isolierung der DNA erfolgte im wesentlichen nach der Methode von Birnboim und Doly (118), wobei ein weiterer Reinigungsschritt durch CsCl-Gradientenzentrifugation im Vertikalrotor (Beckman VT150, 15 h, 45 000 rpm) angeschlossen wurde (Ref.119). Nach

Extraktion des Ethidiumbromids mit einem CsCl-gesättigten n-Butanol/i-Propanol-Gemisch (1:1) wurde die DNA 24 bis 36 h gegen TE-Puffer dialysiert.

Die Mengenbestimmung der DNA erfolgte entweder photometrisch bei 260 nm ($1 A_{260} \hat{=} 50 \mu\text{g DNA/ml}$) oder auf Agarosegelen durch Vergleich eines Aliquots mit einer Verdünnungsreihe von DNA bekannter Konzentration.

4.7. Spaltung von DNA mit Restriktionsnukleasen

Für analytische Spaltungen klonierter DNA wurden 0,5–1 μg DNA mit einem 2- bis 4-fachen Überschuß an Restriktionsenzym 2 h inkubiert. Für KpnI, NotI, SfiI und BssHII wurden die vom Hersteller empfohlenen Puffer verwendet, für alle anderen Enzyme ein Universalpuffer: 0,15 mM Spermin, 0,5 mM Spermidin, 15 mM Tris (pH 7,5), 60 mM KCl, 15 mM NaCl, 0,2 mM EDTA, 0,2 mM EGTA, 7 mM MgCl_2 und 0,5 mM β -Mercaptoethanol (T. Igo-Kemenes, unveröffentlicht). Die Restriktionsspaltungen wurden durch Zugabe von 20 Volumenprozent einer neutralen Lösung von 50 mM EDTA, 4 mM Harnstoff, 50 % Saccharose und 0,1 % Bromphenolblau beendet. Präparative Spaltungen und Spaltungen von genomischer DNA wurden mit entsprechend größeren Mengen analog durchgeführt.

Für Restriktionsspaltungen von DNA, die in eine Agarosematrix eingebettet war, wurde die Pufferzusammensetzung und Inkubationstemperatur nach Herstellerangaben gewählt. Agaroseblöckchen mit 10 μg DNA wurden vor der Restriktionsspaltung für 1 h bei 4°C in 10 ml des jeweiligen Spaltpuffers (mit 0,1 mM PMSF) gespült. Anschließend erfolgte die Spaltung der DNA in einem Puffervolumen von 150 μl mit 50–100 U Enzym für 6 h. Bei Doppelspaltungen wurden die Blöckchen anschließend mit dem Spaltpuffer für das zweite Enzym gespült und noch einmal 6 h gespalten. Die Enzymaktivität wurde durch Zugabe von EDTA-Lösung (100 mM, pH 8,0) gestoppt.

4.8. Gelelektrophoresen und Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen

4.8.1. Konventionelle Gelelektrophoresen bei konstantem und homogenem elektrischem Feld

Gespaltene Cosmid- und Plasmid-DNA sowie partialgespaltene Plazenta-DNA wurde auf horizontalen Agarosegelen (Ref.120, SeaKem Agarose) mit Agarosekonzentrationen von 0,3-2,0 % aufgetrennt. Als Elektrophoresepuffer wurde ein Tris-EDTA-Borat-Puffer (TEB, 90 mM Tris, 2,5 mM EDTA, 90 mM Borsäure; Ref.121) verwendet. Die Auftrennung gespaltener, genomischer DNA erfolgte meist in 6 mm dicken Vertikalgelen. Als Längenstandard diente mit EcoRI und HindIII gespaltene DNA des Phagen λ (cI857 Sam7) oder mit HinfI gespaltene pBR322-DNA. Die Gele enthielten 1 μ g/ml Ethidiumbromid und wurden unter UV-Licht fotografiert.

4.8.2. Pulsfeld-Gelelektrophoresen

Die Auftrennung von DNA mit Hilfe der OFAGE wurde im wesentlichen nach den Angaben von Schwartz, bzw. Carle (79,80,122) durchgeführt. Die Agarosegele (20 X 20 cm; 1,0 % Agarose TypII, Sigma) wurden für 35 bis 42 h bei 15°C in einer Elektrophoresekammer (42 X 42 cm) mit zwei rechtwinklig zueinander angelegten elektrischen Feldern (10,5 V/cm) betrieben. Die beiden Felder wechselten in Intervallen von 20 bis 120 s. Der Elektrophoresepuffer (0,5 X TEB) wurde thermostatisiert und umgepumpt.

Die Feld-Inversions-Gelelektrophorese erfolgte nach den in Ref.81 beschriebenen Bedingungen. Die Dauer der Spannungsimpulse (10,5 V/cm), die während der Elektrophorese (0,5 X TEB; 13°C) linear anstieg, wurde über einen Apple IIe Computer gesteuert. Das zusammen mit B. Straubinger angefertigte Rechenprogramm ist in Ref.59 aufgelistet.

Die CHEF-Elektrophorese wurde nach Ref.82 durchgeführt, wobei die Größe des Gels 15 X 15 cm betrug und Pulszeiten von 20 bis 80 s bei einer Puffertemperatur (0,5 X TEB) von 10°C gewählt wurden.

Nach Beendigung der Elektrophorese wurden die Gele 30 min mit 1 µg/ml Ethidiumbromid in TEB gefärbt und unspezifische Anfärbung durch Waschen der Gele in 0,5 X TEB (2 h) entfernt.

Als Längenstandard dienten neben Hefechromosomen (4.2.) Multimere des Phagen λ . Für die Präparation der λ -Multimeren wurde λ -DNA (Boehringer) in 0,5 %ige LMP Agarose (GIBCO BRL) eingegossen und durch Hybridisierung der kohäsiven Enden in 0,1 M EDTA (pH 8,0) für 48 h oligomerisiert. Bessere Ergebnisse wurden erzielt, wenn Phagen angezogen (62), vor der Lyse (4.6.3.) in Agaroseblöckchen fixiert und anschließend oligomerisiert wurden.

Die Ermittlung der Größen der Hefechromosomen erfolgte mit Hilfe der λ -Multimeren. Dazu wurden beide DNAs nebeneinander auf ein PFG-Gel aufgetragen und nach der Elektrophorese die Molekulargewichte der größeren Hefechromosomen durch Extrapolation der λ -Multimeren (bis 500 kb) bestimmt (59).

Die Apparaturen für die drei beschriebenen Typen der PFG-Elektrophorese wurden von Herrn S. Mann nach den Angaben in der jeweiligen Veröffentlichung (80,81,82) konstruiert.

4.8.3. Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen

Für die präparative Isolierung von DNA aus Agarosegelen wurde Seaplaque Agarose (Marine Colloids) eingesetzt, die bei relativ niedriger Temperatur schmilzt. Nach der elektrophoretischen Auftrennung wurden die jeweiligen Fragmentbanden aus dem Gel ausgeschnitten und mit 4 M NaCl-Lösung eine NaCl-Konzentration von 0,4 M eingestellt. Die Agarose wurde bei 65°C geschmolzen und durch Phenolextraktion entfernt. Schließlich wurde die DNA durch Ethanolfällung konzentriert (123).

4.9. Klonierung von DNA-Fragmenten in pBR322- und M13-Vektoren

Die pBR322- und M13-Vektoren wurden mit Nukleasen gespalten, die kompatible Enden zu den zu klonierenden Restriktionsfragmenten erzeugen. Die lineare Vektor-DNA wurde anschließend mit alkalischer Phosphatase behandelt und nach zwei Phenolextraktionen ethanolgefällt. Das zu klonierende Fragment wurde mit der Vektor-DNA in einer nach Ref.113 berechneten Konzentration mit T4-DNA-Ligase über Nacht bei 14°C ligiert.

Für die Transformation der so erhaltenen rekombinanten Plasmid- oder M13-DNA wurden E. coli-Zellen des Stammes 490A (pBR322) bzw. JM103 (M13) nach der Methode von Dagert und Ehrlich (124) präpariert. Die Transformation wurde nach Messing (125) durchgeführt.

Rekombinante M13-Klone (farblose plaques) wurden mit Hilfe eines sterilen Zahnstochers in 5 ml einer logarithmisch wachsenden E. coli JM103-Kultur ($OD_{580} = 0,5$) überführt und 6-7 h bei 37°C geschüttelt. Die RF-DNA der rekombinanten Phagen wurde aus den infizierten Bakterienkulturen wie in 4.6.4. beschrieben isoliert.

Die Selektion der mit rekombinanten Plasmiden transformierten E. coli 490A-Zellen erfolgte auf L-Agarplatten mit 100 µg/ml Ampicillin. Einzelne Kolonien wurden in jeweils 10 ml LB-Medium (100 µg/ml Ampicillin) gegeben, bei 37°C über Nacht geschüttelt und die Plasmid-DNA nach Birnboim und Doly (118) isoliert.

4.10. DNA-Transfer und Hybridisierungen

Die elektrophoretisch aufgetrennten DNA-Fragmente wurden nach der Methode von Reed und Mann (126) auf Membran-Filter (GeneScreen und GeneScreen plus) transferiert und anschließend durch Backen bei 80°C im Vakuumofen (GeneScreen) oder bei Raumtempe-

ratur getrocknet (GeneScreen plus). Hochmolekulare DNA (PFG-Elektrophorese) wurde vor dem Transfer einem Säureabbau (0,25 N HCl, 30 min, 25°C) unterworfen.

Die Hybridisierungen mit radioaktiv markierten Proben wurden meist nach Ref.69, seltener nach Ref.70 ausgeführt. Bei der Hybridisierung von Koloniefiltern wurde der Hybridisierungslösung 100 µg/ml Lachsspermien-DNA, 50 µg/ml E. coli-DNA und 0,1 µg/ml M13-DNA zugesetzt. Sofern keine anderen Bedingungen angegeben sind, erfolgte der letzte Waschschrift mit 40 mM Phosphatpuffer (pH 7,2) und 1 % SDS bei 68°C. Für die Autoradiographie wurden Fuji RX-Filme zusammen mit CAWO SE6 Verstärkerfolien bei -70°C verwendet.

4.11. Radioaktive Markierung von DNA

Die radioaktive Markierung von DNA erfolgte durch "Nicktranslation" mit (α - 32 P)dATP und (α - 32 P)dCTP, DNase I und DNA-Polymerase I nach Ref.127. Für die Hybridisierung von Gesamt-DNA-Filtern, PFG-Filtern und Koloniefiltern wurde das Fragment des jeweiligen Hybridisierungsklons in hochligierter Form eingesetzt (128).

4.12. Zellkultur

Die Zelllinie BL36 (66) und die Fibroblasten MRC-5 (111) wurden in RPMI1640-Medium bzw. in MEM Dulbecco-Medium, supplementiert mit 15 % fötalem Kälberserum und 4 mM Glutamin bei 37°C, 5 % CO₂ und 100 % Luftfeuchtigkeit kultiviert. PC-3-Zellen (64) wurde bei sonst gleichen Bedingungen 2 mM Glutamin zugesetzt.

Für die Behandlung mit 5-Aza-cytidin (2.3.3.2.) wurde ein nahezu konfluenter Zellrasen von PC-3-Zellen mit Medium überschichtet, das 1 µM bzw. 4 µM Aza-cytidin enthielt. Nach 3 Tagen wurde das Medium erneuert und nach 5 Tagen die Zellen

geerntet. Bei der Behandlung von MRC-5-Zellen mit 1 μ M Azacytidin starben die Zellen nach 2 Tagen ab; eine DNA-Isolierung war daher nicht möglich.

4.13. Biologische Sicherheit

Alle Klonierungsexperimente mit menschlicher DNA wurden entsprechend den "Richtlinien zum Schutz vor Gefahren durch in vitro neukombinierte Nukleinsäuren" (5. überarbeitete Fassung des Bundesgesundheitsamtes, Mai 1986) unter L2-Laborsicherheitsmaßnahmen durchgeführt.

5. Zusammenfassung

Durch die Strukturanalyse des menschlichen K-Locus, wie sie in der Arbeitsgruppe von Professor Zachau durchgeführt wird, kann eine Reihe wichtiger Fragestellungen beantwortet werden. Die Klonierung aller Gensegmente für die variablen Regionen der leichten Immunglobulinketten vom K-Typ würde eine genauere Bestimmung des genetisch determinierten Anteils der Antikörperdiversität ermöglichen. In Verbindung mit der Charakterisierung lymphoider Zelllinien, in denen V_K -Gene umgelagert wurden, erlaubt die Analyse der Anordnung und der relativen Polarität der V- und J-Segmente Aussagen über die molekularen Mechanismen, die für die Umlagerung der Immungensegmente zu funktionellen Genen verantwortlich sind.

In der Arbeitsgruppe wurden neben dem Genomabschnitt, in dem die J_K -Gensegmente und das C_K -Gensegment lokalisiert sind, mehrere Genombereiche kloniert, die V_K -Gensegmente enthalten. Solche in Form überlappender Cosmide und Phagen klonierten Genomabschnitte werden als Regionen bezeichnet. Ein großer Teil dieser Regionen ist in den meisten Individuen dupliziert.

In der vorliegenden Arbeit wurden drei Regionen, die Aa-, Ab- und B-Region näher untersucht. Um diese durch überlappende Cosmide zu erweitern ("chromosomal walking"), wurden zwei Cosmidbanken konstruiert und mit jeweils für die terminalen Bereiche der klonierten Regionen spezifischen Suchklonen abgesucht. Die Ab-Region konnte in 5'-Richtung mit einer anderen, V_K -Gene enthaltenden Region (Ob) zu einem zusammenhängenden Abschnitt von 260 kb Länge verbunden werden. Durch Hybridisierungsexperimente wurde bestätigt, daß alle V_K -Segmente, die in einem der duplizierten Bereiche lokalisiert wurden, die gleiche Transkriptionsrichtung haben.

Die Regionen Aa und Ab (Abb.7) sind durch Duplikation eines Vorläufers entstanden. Zwei Cosmide, die mit Hilfe V_K -spezifischer Suchklone isoliert worden waren, konnten nach Restriktionskartierung und Hybridisierung mit V_K -Proben der 3'-Seite der A-Regionen zugeordnet werden. Durch diese Cosmide wurde ge-

zeigt, daß die Homologie zwischen den Duplikaten Aa und Ab in diesem Bereich abbricht. Genauere Analysen dieses Abschnittes ergaben, daß der Unterschied zwischen der a- und der b-Situation auf der Insertion oder Deletion einer Sequenz von 15 bis 40 kb Länge beruht. Der nicht duplizierte Bereich enthält ein V_K -Gen, das durch Hybridisierungsversuche charakterisiert wurde. Möglicherweise stellt es einen Vertreter einer neuen Subgruppe aus drei bis vier Mitgliedern dar.

Die dritte hier bearbeitete Region, die B-Region (Abb.10), enthält neben dem einzigen Mitglied der V_K -Subgruppe IV (B3) zwei weitere von den Subgruppen I-III divergente V_K -Gene (B1, B2). Durch Hybridisierung genomischer DNA wurde gezeigt, daß das Gen B1 zu einer Gruppe von zwei V_K -Genen gehört, die nicht in die Subgruppen-Klassifikation passen. Das zugehörige zweite Gen wurde bisher nicht kloniert. Nachdem die B-Region durch chromosomal walking mit der J_K - C_K -Region verknüpft worden war, und die 5'-3'-Polarität der hier lokalisierten V_K -Gene relativ zu den J_K -Segmenten bekannt war, konnten konkrete Aussagen über die V-J-Rekombination dieser Gene gemacht werden. Die Gene B2 und B3 sind in entgegengesetzter Polarität zu J_K - C_K angeordnet und müssen durch einen Inversionsmechanismus umgelagert werden. Das V-Segment B1 hat die gleiche Transkriptionsrichtung wie die J_K -Segmente und wird durch Deletion der DNA zwischen V und J umgelagert. Mit diesen Daten konnten die Umlagerungsvorgänge in einigen lymphoiden Zelllinien nachvollzogen werden. So konnte z.B. eine publizierte Nukleotidsequenz als das Produkt zweier aufeinanderfolgender Inversionen erklärt werden (Abb.18).

Mit Hilfe der Pulsfeld-Gelelektrophorese und selten spaltenden Restriktionsnukleasen sollte eine Restriktionskarte des gesamten K-Locus erstellt werden. Zu diesem Zweck wurden zwei Elektrophoreseverfahren etabliert.

Spezifische Suchklone aus den in Cosmiden klonierten, duplizierten Regionen des Locus hybridisieren mit zwei großen NotI-Fragmenten. Diese Fragmente wurden mittels präparativer PFG-Elektrophorese isoliert. Durch Hybridisierungsversuche mit

Proben, die zwischen den Duplikaten unterscheiden können, wurde je eine Situation der duplizierten Regionen einem der NotI-Fragmente zugeordnet.

Indem genomische DNA mit zwei Nukleasen gespalten und mit spezifischen Proben hybridisiert wurde, konnte eine Restriktionskarte der gesamten klonierten Bereiche konstruiert werden (Abb.16). Dadurch konnten die Abstände zwischen den bisher klonierten Teilen des K-Locus bestimmt werden. Aus den Abständen konnte abgeschätzt werden, wie groß die Bereiche sind, die zur vollständigen Klonierung des Locus noch fehlen. Als minimale Größe des K-Locus wurden 1,5 Mb ermittelt. Da die NotI-Fragmente, welche die bislang klonierten Teilbereiche enthalten, im Genom nicht direkt benachbart sein müssen, kann die tatsächliche Größe des Locus noch darüber liegen.

Die in diesen Versuchen verwendete DNA aus einer Prostatakarzinom-Zelllinie wurde mit DNAs aus verschiedenen, nicht verwandten Individuen verglichen. Bezüglich der Grobstruktur des K-Locus wurden keine Unterschiede zwischen der Zelllinie und Individuen, die den K-Locus vollständig enthalten, festgestellt.

Die PFG-Kartierung des K-Locus ermöglichte es, einige Fragen nach der Umlagerung von V_K -Genen aus den duplizierten Bereichen des Locus zu beantworten (Abb.19). Bis auf zwei direkt 5' von J_K-C_K lokalisierte V-Segmente in der B-Region haben alle V_K -Gene, die innerhalb des C_K -proximalen Duplikats charakterisiert wurden, die gleiche 5'-3'-Orientierung wie J_K-C_K . Sie werden durch einen Deletionsmechanismus oder durch Schwesterchromatidaustausch umgelagert. Aufgrund der Restriktionskarte allein liegt die 5'-3'-Orientierung der C_K -distalen V-Segmente relativ zu J_K-C_K nicht fest. Einige Beobachtungen an lymphoiden Zelllinien mit umgelagerten Gensegmenten lassen sich am besten mit V-J-Rekombination durch einen Inversionsmechanismus erklären. Daher wird angenommen, daß die in der C_K -distalen Kopie lokalisierten V_K -Gene eine zu J_K-C_K entgegengesetzte Polarität aufweisen und durch Inversion umgelagert werden. Durch diese Anordnung der Gensegmente des K-Locus ist gewährleistet, daß auch für mehrere aufeinanderfolgende Umlagerungen innerhalb eines K-Allels eine maximale Anzahl von V-Segmenten zur Verfügung steht.

6. Literaturverzeichnis

1. Roitt, J., Brostoff, J. und Male, D. (1985) Immunology, Gower Medical Publishing
2. Honjo, T. und Habu, S. (1985) Ann. Rev. Biochem. 54, 803-830
3. Babbitt, B., Allen, G., Matsueda, E., Haber, E. und Unanue, E. (1985) Nature 317, 359-361
4. Guillet, J.-G., Lai, M.-Z., Briner, T.J., Smith, J.A. und Geftter, M.L. (1986) Nature 324, 260-262
5. Tonegawa, S. (1983) Nature 302, 575-581
6. Honjo, T. (1983) Ann. Rev. Immunol. 1, 499-528
7. Milstein, C. (1967) Nature 216, 330-332
8. Wang, A.C., Fudenberg, H.H., Wells, J.V. und Roelke, D. (1973) Nature New Biology 243, 126-127
9. Kabat, E.A., Wu, T.T., Reid-Miller, M., Perry, H.M. und Gottesmann, K.S. (1987) Sequences of Proteins of Immunological Interest, Fourth Edition, NIH Publication
10. Dreyer, W.J. und Bennet, J.C. (1965) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 54, 864-869
11. Hilschmann, N. und Craig, L.C. (1965) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 53, 1403-1409
12. Hozumi, N. und Tonegawa, S. (1976) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 73, 3628-3632
13. Bernard, O., Hozumi, N. und Tonegawa, S. (1978) Cell 15, 1133-1144
14. Max, E.E., Seidman, J.G. und Leder, P. (1979) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 76, 3450-3454
15. Sakano, H., Hüppi, K., Heinrich, G. und Tonegawa, S. (1979) Nature 280, 288-294
16. Early, P., Huang, H., Davis, M., Calame, K. und Hood, L. (1980) Cell 19, 981-992
17. Kurosawa, Y. und Tonegawa, S. (1982) J. Exp. Med. 155, 201-218
18. Alt, F. und Baltimore, D. (1982) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 79, 4118-4122

19. Pech, M., Höcht1, J., Schnell, H. und Zachau, H.G. (1981) Nature 291, 668-670
20. Baltimore, D. (1981) Cell 26, 295-296
21. Griffiths, G.M., Berek, C., Kaartinen, M. und Milstein, C. (1984) Nature 312, 271-275
22. Bentley, D.L. und Rabbitts, T.H. (1981) Cell 24, 613-623
23. Bentley, D.L. (1984) Nature 307, 77-80
24. Cory, S., Tyler, B.M. und Adams, J.M. (1981) J. Mol. Appl. Genet. 1, 103-116
25. Kodaira, M., Kinashi, T., Umemura, J., Matsuda, F., Noma, T., Ono, Y. und Honjo, T. (1986) J. Mol. Biol. 190, 529-541
26. Berman, J.E., Mellis, S.J., Pollock, R., Smith, C.L., Heikyung, S., Heinke, B., Kowal, C., Surti, U., Chess, L., Cantor, C.R. und Alt, F.W. (1988) EMBO J. 7, 727-738
27. Lewis, S., Rosenberg, N., Alt, F. und Baltimore, D. (1982) Cell 30, 807-816
28. Höcht1, J. und Zachau, H.G. (1983) Nature 302, 260-263
29. Steinmetz, M., Altenburger, W. und Zachau, H.G. (1980) Nucl. Acids Res. 8, 1709-1720
30. Selsing, E. und Storb, U. (1981) Nucl. Acids Res. 9, 5725-5735
31. Seidman, J.G., Nau, M.M., Norman, B., Kwan, S.P., Scharff, M. und Leder, P. (1980) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77, 6022-6026
32. vanNess, B.G., Coleclough, C., Perry, R.P. und Weigert, M. (1982) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 79, 262-266
33. Höcht1, J., Müller, C.R. und Zachau, H.G. (1982) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 79, 1383-1387
34. Pech, M., Smola, H., Pohlenz, H.-D., Straubinger, B., Gerl, R. und Zachau, H.G. (1985) J. Mol. Biol. 183, 291-298
35. Straubinger, B., Huber, E., Lorenz, W., Osterholzer, E., Pargent, W., Pech, M., Pohlenz, H.-D., Zimmer, F.-J. und Zachau, H.G. (1988) J. Mol. Biol. 199, 23-34
36. Pohlenz, H.-D., Straubinger, B., Thiebe, R., Pech, M., Zimmer, F.-J. und Zachau, H.G. (1987) J. Mol. Biol. 193, 241-253

37. Klobeck, H.-G., Bornkamm, G.W., Combriato, G., Mocikat, R., Pohlenz, H.-D. und Zachau, H.G. (1985) Nucl. Acids Res. 13, 6515-6529
38. Hieter, P.A., Max, E.E., Seidman, J.G., Maizel, J.V. und Leder, P. (1980) Cell 22, 197-207
39. Klobeck, H.-G. und Zachau, H.G. (1986) Nucl. Acids Res. 14, 4591-4603
40. van Ommen, G.J.B., Verkerk, J.M.H., Hofker, M.H., Monaco, A.P., Kunkel, L.M., Ray, P., Worton, R., Wieringa, B., Bakker, E. und Pearson, P.L. (1986) Cell 47, 499-504
41. Hardy, D.A., Bell, J.I., Long, E.O., Lindsten, T. und McDavitt, H.O. (1986) Nature 323, 453-455
42. McBride, O.W., Hieter, P.A., Hollis, G.F., Swan, D., Otey, M.C. und Leder, P. (1982) J. Exp. Med. 155, 1480-1490
43. Malacchi, S., Barton, P., Murphy, C., Ferguson-Smith, M.A., Bentley, D.L. und Rabbitts, T.H. (1982) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 79, 4957-4961
44. Lötscher, E., Grzeschik, K.-H., Bauer, H.G., Pohlenz, H.-D., Straubinger, B. und Zachau, H.G. (1986) Nature 320, 456-458
45. Morrow, J.F. (1980) Methods in Enzymology 68, 3-24 Academic Press, New York
46. Collins, J. und Hohn, B. (1978) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 75, 4242-4246
47. Collins, J. und Brüning, H.J. (1978) Gene 4, 85-107
48. Hohn, B. und Murray, K. (1977) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 74, 3259-3263
49. Hohn, B. und Collins, J. (1980) Gene 11, 291-298
50. Swartz, M.N., Trautner, T.A. und Kornberg, A. (1962) J. Biol. Chem. 237, 1961-1967
51. Pohlenz, H.-D. (1986) Dissertation, Fakultät für Chemie und Pharmazie der Universität München
52. Steinmetz, M., Stephen, D., Dastoornikoo, G.R., Gibb, E. und Romaniuk, R. (1985) Immunological Methods III, 1-19
53. Blin, N. und Stafford, D.W. (1976) Nucl. Acids Res. 3, 2302-2308
54. Clarke, L. und Carbon, J. (1976) Cell 9, 91-99

55. Pargent, W. Dissertation in Vorbereitung
56. Zimmer, F.-J. Dissertation in Vorbereitung
57. Klobeck, H.-G., Zimmer, F.-J., Combriato, G. und Zachau, H.G. (1987) Nucl. Acids Res. 15, 9655-9665
58. Jaenichen, H.-R., Pech, M., Lindenmaier, W., Wildgruber, N. und Zachau, H.G. (1984) Nucl. Acids Res. 12, 5249-5263
59. Straubinger, B. (1987) Dissertation, Fakultät für Chemie und Pharmazie der Universität München
60. Bauer, H.G. (1986) Dissertation, Fakultät für Biologie der Universität München
61. Straubinger, B., Thiebe, R., Huber, C., Osterholzer, E. und Zachau, H.G. (1988) Hoppe-Seylers Z. Physiol. Chem. 369, 601-607
62. Maniatis, T., Fritsch, E.F. und Sambrook, J. (1982) Molecular Cloning, Cold Spring Harbor Laboratory, New York
63. Smola, H. (1988) Dissertation, Medizinische Fakultät der Universität München
64. Kaighn, M.E., Narayan, K.S., Ohnuki, Y., Lechner, J.F. und Jones, L.W. (1979) Inv. Urol. 17, 16-23
65. Huber, E. Dissertation in Vorbereitung
66. Klobeck, H.-G., Meindl, A., Combriato, G., Solomon, A. und Zachau, H.G. (1985) Nucl. Acids Res. 13, 6499-6513
67. Meindl, A. Dissertation in Vorbereitung
68. Klobeck, H.-G., Solomon, A. und Zachau, H.G. (1984) Nature 309, 73-76
69. Church, G.M. und Gilbert, W. (1984) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81, 1991-1995
70. Schnell, H., Steinmetz, M., Zachau, H.G. und Schechter, I. (1980) Nature 286, 170-173
71. Schäble, K.F. Dissertation in Vorbereitung
72. Lorenz, W., Schäble, K.F., Thiebe, R., Stavnezer, J. und Zachau, H.G. (1988) Mol. Immunol. 25, 479-484
73. Stavnezer, J., Kekish, O., Batter, D., Grenier, J., Balazs, I., Henderson, E. und Zegers, B.J.M. (1985) Nucl. Acids Res. 13, 3495-3514

74. Lai, E., Concannon, P. und Hood, L. (1988) *Nature* 331, 543-546
75. Brodeur, P.H., Osman, G.E., Mackle, J.J. und Lalor, T.M. (1988) *J. Exp. Med.* 168, 2261-2278
76. Bentley, D.L. und Rabbitts, T.H. (1983) *Cell* 32, 181-189
77. Mocikat, R., Klobeck, H.-G. und Zachau, H.G. (1987) *Hoppe-Seylers Z. Physiol. Chemie* 368, 913-920
78. Schwartz, D.C., Saffran, W., Welsh, J., Haas, R., Goldenberg, M. und Cantor, C.R. (1982) *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* 47, 189-195
79. Schwartz, D.C. und Cantor, C.R. (1984) *Cell* 37, 67-75
80. Carle, G.F. und Olson, M.V. (1984) *Nucl. Acids Res.* 12, 5647-5664
81. Carle, G.F., Frank, M. und Olson, M.V. (1986) *Science* 232, 65-68
82. Chu, G., Vollrath, D. und Davis, R.W. (1986) *Science* 234, 1582-1585
83. Lorenz, W., Straubinger, B. und Zachau, H.G. (1987) *Nucl. Acids Res.* 15, 9667-9676
84. Weichhold, G. Dissertation in Vorbereitung
85. Lindsay, S. und Bird, A.P. (1987) *Nature* 327, 336-338
86. Kessler, C., Neumaier, P.S. und Wolf, W. (1985) *Gene* 33, 1-102
87. Jones, P.A. und Taylor, S.M. (1980) *Cell* 20, 85-93
88. Dobkin, C., Ferrando, C. und Brown, W.T. (1987) *Nucl. Acids Res.* 15, 3183
89. Klobeck, H.-G., Combriato, G. und Zachau, H.G. (1984) *Nucl. Acids Res.* 12, 6995-7006
90. Erikson, J., Nishikura, K., Ar-Rushdi, A., Finan, J., Emanuel, B., Lenoir, G., Nowell, P.C. und Croce, C.R. (1983) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 80, 7581-7585
91. Klobeck, H.-G., Combriato, G. und Zachau, H.G. (1987) *Nucl. Acids Res.* 15, 4877-4888
92. Pech, M. und Zachau, H.G. (1984) *Nucl. Acids Res.* 12, 9229-9236

93. Gibson, T.J., Coulson, A.R., Sulston, J.E. und Little, P.F.R. (1987) *Gene* 53, 275-281
94. Nicholls, R.D., Fischel-Ghodsian, N. und Higgs, D.R. (1987) *Cell* 49, 369-378
95. Coulson, A., Waterston, R., Kiff, J., Sulston, J. und Kohara, Y. (1988) *Nature* 335, 184-186
96. Rigas, B., Welcher, A.A., Ward, D.C. und Weissman, S.M. (1986) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 83, 9591-9595
97. Burke, D.T., Carle, G.F. und Olson, V. (1987) *Science* 236, 806-812
98. Smith, C.L., Matsumoto, T., Niwa, O., Klco, S., Fan, J.-B., Yanagida, M. und Cantor, C.R. (1987) *Nucl. Acids Res.* 15, 4481-4489
99. Vollrath, D. und Davis, R.W. (1987) *Nucl. Acids Res.* 15, 7865-7876
100. Collins, F.S. und Weissman, S.M. (1984) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81, 6812-6816
101. Lewis, S., Gifford, A. und Baltimore, D. (1984) *Nature* 308, 425-428
102. Hesse, J.E., Lieber, M.R., Gellert, M. und Mizuuchi, K. (1987) *Cell* 49, 775-783
103. Malissen, M., McCoy, C., Blanc, D., Trucy, J., Devaux, C., Schmitt-Verhulst, A.-M., Fitch, F., Hood, L. und Malissen, B. (1986) *Nature* 319, 28-33
104. Deev, S.M., Combriato, G., Klobeck, H.-G. und Zachau, H.G. (1987) *Nucl. Acids Res.* 15, 1-13
105. Feddersen, R.M. und vanNess, B.G. (1985) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82, 4793-4797
106. Steinmetz, M., Altenburger, W. und Zachau, H.G. (1980) *Nucl. Acids Res.* 8, 1709-1720
107. Klobeck, H.-G., Adolph, S., Hameister, H. und Zachau, H.G. (1988) *Nucl. Acids Res.* 16, 6243
108. Klobeck, H.-G., Kozak, C.A. und Zachau, H.G. (1988) *Nucl. Acids Res.* 16, 7190
109. Erbslöh, A. (1974) Diplomarbeit, Fakultät für Biologie, Universität Freiburg

110. Leder, P., Tiermeier, D. und Enquist, L. (1977) Science 196, 175-177
111. Jakobs, J.P., Jones, C.M. und Baille, J.P. (1970) Nature 227, 168-170
112. Pech, M. und Zachau, H.G. (1984) Nucl. Acids Res. 12, 9229-9236
113. Dugaiczky, A., Boyer, H.W. und Goodman, H.M. (1975) J. Mol. Biol. 96, 171-184
114. Hanahan, D. und Meselson, M. (1983) Methods in Enzymology 100, 333-342, Academic Press, New York
115. Benton, W.D. und Davis, R.W. (1977) Science 196, 180-182
116. Gross-Bellhard, M., Oudet, P. und Chambon, P. (1973) Eur. J. Biochem. 36, 32-38
117. Schneider, J.A. und Schelman, J.D. (1982) The Metabolic Basis of Inherited Disease, 1844-1866, McGraw Hill, New York
118. Birnboim, H.C. und Doly, J. (1979) Nucl. Acids Res. 7, 1513-1523
119. Tanaka, T. und Weißblum, B. (1975) J. Bacteriol. 121, 354-362
120. Aaij, C. und Borst, P. (1972) Biochim. Biophys. Acta 269, 192-200
121. Peacock, A.C. und Dingman, C.W. (1967) Biochemistry 6, 1818-1827
122. Smith, C.L., Warburton, P.E., Gaal, A. und Cantor, C.R. (1986) Genetic Engineering, Vol.8, 45-70, Plenum Press, New York
123. Gafner, J., De Robertis, E.M. und Philippsen, P. (1983) EMBO J. 2, 583-591
124. Dagert, M. und Ehrlich, S.D. (1979) Gene 6, 23-28
125. Messing, J. (1983) Methods in Enzymology 101, 20-78
126. Reed, K.C. und Mann, D.A. (1985) Nucl. Acids Res. 13, 7207-7221
127. Rigby, P.W.J., Dieckmann, M. und Berg, P. (1977) J. Mol. Biol. 113, 237-251

128. Meinkoth, J. und Wahl, G. (1984) *Analyt. Biochem.* 138, 269-284
129. "Abbreviations and Symbols for Nucleic Acids, Polynucleotides and their Constituents" (1970) *Eur. J. Biochem.* 15, 203-208
130. Smith, H.O. und Nathans, D. (1973) *J. Mol. Biol.* 81, 419-423

7. Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
bp	Basenpaar
C	konstante Region der Immunglobuline
CHEF	"contour-clamped homogeneous electric field"- Elektrophorese
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
FIGE	Feld-Inversions-Gel-Elektrophorese
h	Stunden
H-Kette	schwere Kette der Immunglobuline
J	"joining segment": Gensegment der V-Region der leichten und schweren Ketten
kb	Kilobasenpaare (1000 bp)
L	"leader"-Sequenz, Signalpeptidbereich
L-Kette	leichte Kette der Immunglobuline
Mb	Megabasenpaare (10^6 bp)
min	Minuten
OD	optische Dichte
OFAGE	"orthogonal field alternation gel electrophoresis"
PBS	"phosphate buffered saline" (55 mM Dinatrium- hydrogenphosphat; 4,5 mM Natriumdihydrogenphosphat; 65 mM Natriumchlorid; pH 8,0)
PFG	Puls-Feld-Gelelektrophorese
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
Ref.	Referenz
s	Sekunden
SDS	Natriumlaurylsulfat
SSC	Standard-Saline-Citrat (150 mM Natriumchlorid; 15 mM Natriumcitrat; pH 7,0)
TE	Tris-EDTA-Puffer (10 mM Tris, 1 mM EDTA, pH 8,0)
TEB	Tris-EDTA-Borat-Puffer (90 mM Tris, 2,5 mM EDTA, 90 mM Borsäure)
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
V	variable Region der Immunglobuline
V _K	variable Region der leichten Ketten vom K-Typ (Gensegmente hierfür wurden z.T. als Gene bezeichnet)

Subklone sind mit Kleinbuchstaben und Zahlen bezeichnet, wobei der Buchstabe den Vektor angibt (p=pBR322, m=M13) und die Zahl das Ursprungscosmid. Verschiedene Subklone von einem Cosmid sind fortlaufend nummeriert.

Folgende Kurzbezeichnungen für Restriktionsnukleasen wurden in den Abbildungen verwendet:

Ac=AccI, Bg=BglII, Bm=BamHI, Cl=ClaI, Ec=EcoRI, HII=HindII, HIII=HindIII, Hp=HpaI, Kp=KpnI, Ml=MluI, PII=PvuII, Ps=PstI, Sa=SacI, Sc=ScaI, Sf=SfiI, Sl=SalI, Sm=SmaI, Sp=SphI, St=StuI, Xb=XbaI, Xh=XhoI.

Alle anderen Angaben erfolgten gemäß den Empfehlungen der "IUPAC-IUB. Commission on Biochemical Nomenclature" (129,130).

Lebenslauf

Name: Lorenz

Vorname: Wulfig

Geburtsdatum: 3.12.1958

Geburtsort: Coburg, Bayern

Familienstand: verheiratet

Schulbildung: 1965-1966 Grundschule in Cuxhaven
1966-1968 Grundschule in Sahlenburg
1968-1969 Gymnasium in Cuxhaven
1969-1977 Gymnasium in Bad Homburg

Wehrdienst: Juli 1977 bis September 1978

Hochschulstudium: 1978-1985 Universität Hohenheim
Studiengang Biologie (Diplom)
Diplomarbeit am Institut für Mikrobiologie
bei Professor F. Lingens
Thema: Versuche zur Affinitätschromatographie
meta-spaltender Dioxygenasen

Dissertation: seit 1985 am Institut für Physiologische
Chemie, Physikalische Biochemie und
Zellbiologie der Universität München,
bei Professor H.G. Zachau

